

Expression von
Matrix-Metalloproteinasen bei
Colitis ulcerosa:
Kohortenstudie des
Universitätsklinikums Stavanger,
Norwegen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Jörg Michael Halwe
aus Friedberg/Hessen

Gießen, 2010

Expression von
Matrix-Metalloproteinasen bei
Colitis ulcerosa:
Kohortenstudie des
Universitätsklinikums Stavanger,
Norwegen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Jörg Michael Halwe
aus Friedberg/Hessen

Gießen, 2010

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Medizinischen Klinik II und Poliklinik

Leiter: Prof. Dr. med. Werner Seeger

Schwerpunkt Gastroenterologie

Leiterin: Prof. Dr. med. Elke Roeb

der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH

Standort Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Elke Roeb

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus-Peter Zimmer

Tag der Disputation: 20. Dezember 2010

Teile der vorliegenden Arbeiten wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Abstracts

T Rath, M Roderfeld, **JM Halwe**, E Roeb. Erste Hinweise auf eine Mukosaprotektion durch Epilysin (MMP-28) bei Colitis ulcerosa. *Z Gastroenterol* 2009; 47:881A.

JM Halwe, T Rath, M Roderfeld, SB Wildhagen, E Roeb. Expression av Matrix-Metalloproteinaser (MMP) ved ulcerøs kolitt: En kohortstudie ved Stavanger Universitetssjukehus. NGF 37. Årsmøte Lillehammer. Mündliche Präsentation.

T Rath, M Roderfeld, **JM Halwe**, E Roeb. Zellulärer Ursprung von MMP-7, -13 und -28 bei Colitis ulcerosa. *Z Gastroenterol* 2010;48:949

Originalarbeiten

T Rath, M Roderfeld, **JM Halwe**, A Tschuschner, J Graf, E Roeb. Cellular sources of MMP-7, MMP-13 and MMP-28 in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2010 Oct;45 (10):1186-96

Für
Nanett und Marthe

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	12
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	14
2.1	Das Krankheitsbild der Colitis ulcerosa.....	14
2.1.1	Epidemiologie	14
2.1.2	Ätiologie und Pathogenese	14
2.1.3	Klinik und Diagnostik.....	17
2.1.4	Colitis ulcerosa und Malignität.....	21
2.1.4.1	Klinisches Bild von Dysplasien und Karzinomen	21
2.1.4.2	Histopathologische Einteilung von Dysplasien	23
2.1.4.3	Kolorektale Karzinogenese.....	23
2.1.5	Calprotektin.....	26
2.2	Matrix Metalloproteinasen	27
2.2.1	Extrazelluläre Matrix	27
2.2.2	Familie der Matrix Metalloproteinasen	28
2.2.3	Domänenstruktur der Matrix Metalloproteinasen.....	30
2.2.4	Übersicht der Matrix Metalloproteinasen	33
2.2.5	Die Regulation der Matrix Metalloproteinasen	35
2.2.6	MMPs und Malignität	37
2.2.7	MMPs und chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	40
2.2.8	In der Studie untersuchte MMPs.....	42
2.2.8.1	MMP-1	42
2.2.8.2	MMP-8.....	43
2.2.8.3	MMP-13.....	43
2.2.8.4	MMP-7	44
2.2.8.5	MMP-19.....	45
2.2.8.6	MMP-26.....	46
2.2.8.7	MMP-28.....	46
3	AUFGABENSTELLUNG.....	47

4	MATERIAL UND METHODEN	48
4.1	Aufbau der Studie.....	48
4.1.1	Rahmenbedingungen.....	48
4.1.2	Amtliche Gesuche	48
4.2	Materialgewinnung und -aufbewahrung.....	49
4.3	Klinische Daten	51
4.3.1	Anamnese.....	51
4.3.2	Endoskopiescore	51
4.3.3	Histologische Diagnostik	51
4.3.4	Symptomscore.....	52
4.3.5	Blutwerte	53
4.3.6	Stuhlproben	53
4.4	Isolation der RNA	54
4.5	Synthese der komplementären DNA (cDNA).....	56
4.6	RT-PCR	58
4.7	ELISA	64
4.7.1	Isolierung der Mikrosomen.....	64
4.7.2	Proteinmessung nach Bradford	65
4.7.3	Durchführung der ELISA	66
4.8	Immunhistochemie	69
4.9	Statistische Auswertung	73
5	ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG.....	75
5.1	Klinische Daten	75
5.1.1	Klinische und endoskopische Befunde	79
5.1.2	Histologische Ergebnisse	81
5.2	Bestimmung der MMP-Genexpression.....	83
5.2.1	Relative Genexpression von MMP-1	85
5.2.2	Relative Genexpression von MMP-7.....	87
5.2.3	Relative Genexpression von MMP-13.....	89
5.2.4	Relative Genexpression von MMP-19.....	91
5.2.5	Relative Genexpression von MMP-28.....	93

5.2.6	Übersicht aller mit RT-PCR untersuchten MMPs	95
5.2.7	Quantitative Proteinbestimmung von MMP-7	96
5.2.8	Fäkales Calprotektin	100
5.3	Ergebnisse der Immunhistochemie	103
5.3.1	MMP-13	103
5.3.2	MMP-28	108
6	DISKUSSION	111
7	ZUSAMMENFASSUNG	119
8	SUMMARY	121
9	AUSBLICK	123
10	LITERATURVERZEICHNIS	124
11	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND TERMINI TECHNICAL	137
12	ANHANG	141
13	DANKSAGUNG	144
14	ERKLÄRUNG	145

1 EINLEITUNG

Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen haben ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Darmkrebs. Ein Zusammenhang zwischen Darmkrebs und Colitis ulcerosa wurde schon 1925 von Crohn und Rosenberg beschrieben ¹.

Eine 2001 publizierte Metaanalyse zeigte ein kumulatives Risiko für die Entwicklung von Darmkrebs bei Patienten mit Colitis ulcerosa von 8 % nach 20 Jahren und 18 % nach 30 Jahren Krankheitsdauer bei Vorliegen einer Colitis totalis ². Andere Studien zeigten ein vergleichbares Risiko für Patienten mit Morbus Crohn.

Matrix Metalloproteinasen (MMP) sind zinkbindende Endopeptidasen und bilden eine Familie proteolytischer Enzyme. Sie bauen fast alle Komponenten der extrazellulären Matrix und die Basalmembran ab. Dadurch nehmen diese Proteasen eine zentrale Rolle in vielen physiologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Embryogenese, der Wundheilung und der Angiogenese, ein.

In gesundem Gewebe wird der proteolytische Effekt der MMPs zur Regulierung der Homöostase der extrazellulären Matrix mit Hilfe körpereigener MMP-Inhibitoren exakt reguliert. Fehler in dieser Balance sind mit verschiedenen Krankheiten, wie z. B. Fibrose, Arthritiden und bösartigen Tumoren assoziiert.

Funktionell werden die verschiedenen MMPs an Remodulierungsprozesse bei Tumorwachstum und Metastasierung gekoppelt. Eine Erhöhung ihrer Expression konnte bei vielen malignen Tumoren nachgewiesen werden.

In mehreren vorausgegangenen Arbeiten ist die Bedeutung der MMPs für die kolorektale Karzinogenese untersucht worden. Dabei hat sich gezeigt, dass MMP-2, MMP-7 und MMP-13 beim kolorektalen Karzinom erhöht exprimiert werden. MMP-9 dagegen wird nur beim Kolonkarzinom, nicht aber beim Rektumkarzinom, vermehrt exprimiert ^{3,4,5}.

In einer Arbeit von Rath et al. aus dem Jahre 2006 ist die Expression von MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-13 und MMP-14 bei Vorliegen präkanzeröser Erkrankungen in Form einer Colitis ulcerosa, eines Morbus Crohns und von adenomatösen Polypen untersucht worden ⁶. Es konnte gezeigt werden, dass MMP-7 und MMP-13 bei allen drei Krankheitsbildern vermehrt exprimiert wird. Es ergibt sich daraus die Vermutung, dass

MMP-7 und MMP-13 an der malignen Transformation von Zellen beteiligt ist, noch bevor sich histopathologische Veränderungen nachweisen lassen.

Eine erhöhte Expression genau dieser MMPs konnte in früheren Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppe bei invasiven kolorektalen Karzinomen nachgewiesen werden.

Unklar ist immer noch, ob die erhöhte Expression bestimmter MMPs im Rahmen einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung alleiniges Resultat einer benignen Entzündung ist und damit nur von der Entzündungsaktivität abhängig ist, oder ob sie bereits ein erstes Anzeichen für eine maligne Transformation darstellt.

In dieser Arbeit sollten deshalb die objektiven klinischen und histologischen Parameter von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen registriert, und mit der Expression der Matrix Metalloproteinasen -1, -7, -13, -19 und -28 korreliert werden. Die histologischen Präparate wurden besonders auf das Vorliegen von Dysplasien untersucht. Die Expression der MMPs sollte sowohl auf RNA-Ebene mit Hilfe der RT-PCR, als auch auf Proteinebene mittels ELISA bestimmt werden.

Bei nachgewiesener Veränderung der Expression im Vergleich zur Referenzprobe sollte der zelluläre Ursprung der MMPs mit Hilfe der Immunhistochemie bestimmt werden.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Das Krankheitsbild der Colitis ulcerosa

2.1.1 Epidemiologie

Die Inzidenz der Colitis ulcerosa (CU) liegt in Deutschland bei ca. 4-6 pro 100.000 Einwohner pro Jahr ^{7,8}, wobei in Deutschland nur verhältnismäßig wenige Studien über die Epidemiologie der CU vorliegen. Die Prävalenz der CU liegt bei 27 pro 100.000 Einwohnern ⁷. Die Inzidenz des Morbus Crohns (MC) liegt in Europa bei 3,6 pro 100.000 Einwohnern ⁹ und ist damit niedriger als die der CU.

Es bestehen deutliche geographische Unterschiede mit den höchsten Inzidenzen von CU in Nordamerika, Nordeuropa und Großbritannien ¹⁰. Innerhalb von Europa liegen die Inzidenzen in Nordeuropa ca. 40 % über denen in den südeuropäischen Ländern ⁹.

In Norwegen ist die Inzidenz der CU relativ gut in prospektiven, populationsbasierten Studien untersucht worden. Dabei zeigte sich in Norwegen eine Inzidenz der CU von 12,8 bis 16,9 pro 100.000 Einwohnern pro Jahr ^{11,12,13}, sie ist damit bedeutend höher als in Deutschland.

Die CU kann in jedem Alter auftreten, zeigt aber zwei Häufigkeitsgipfel im Alter zwischen 15 und 30 sowie zwischen 50 und 80 Jahren.

2.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Colitis ulcerosa gehört zusammen mit dem Morbus Crohn zu den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Sie bilden die beiden klinisch und histologisch gut zu definierenden Hauptformen. Fälle, die nicht eindeutig einer der beiden Krankheitsbilder zugeordnet werden können, werden als Colitis indeterminata bezeichnet.

Bei der CU handelt es sich um eine chronische Darmerkrankung. Bei der überwiegenden Mehrheit der Patienten ist der Krankheitsverlauf chronisch-rezidivierend, in selteneren Fällen chronisch-kontinuierlich oder fulminant.

Die genaue Ätiologie ist bis heute unklar. Es werden verschiedene auslösende Faktoren, wie z. B. eine genetische Disposition, autoimmunologische und infektiöse Genesen diskutiert.

Verwandte 1. Grades haben ein drei- bis 20-fach höheres Risiko gegenüber der Normalbevölkerung, ebenfalls an einer CU zu erkranken ¹⁴. Da man für diese Verwandten auch ein zweifach erhöhtes Risiko für einen MC gefunden hat, vermutet man, dass es durch Mutationen gemeinsamer Gene zur Ausbildung der jeweiligen Erkrankung kommen kann ¹⁵. Die Bedeutung einer genetischen Disposition wurde durch Zwillingsstudien bestätigt. Eineiige Zwillinge haben ein Risiko von über 50 %, ebenfalls an einer CED zu erkranken. Bei zweieiigen Zwillingen liegt das Risiko bei unter 5 % ¹⁶.

Mutationen im NOD2/CARD15 Gen auf dem Locus IBD1 des Chromosoms 16q12 sind mit einem erhöhten Risiko für die Ausbildung eines MC verbunden ¹⁷.

Die u.a. von Makrophagen und Granulozyten exprimierten NOD2/CARD 15 (*nucleotide-binding-oligomerisation-domains 2 / caspase activation and recruitment domain 15*) fungieren als bakterielle Sensorproteine ¹⁸. Sie können durch Bakterienbestandteile wie Lipopolysaccharide und Peptidoglykane aktiviert werden und führen ihrerseits zur Aktivierung von NF κ B ¹⁹. Der Aufbau des Sensorproteins und dessen drei Hauptmutationsformen sind in Abb. 1 auf S. 11 schematisch dargestellt.

Der Transkriptionsfaktor NF κ B (*nuclear factor kappa B*) ist für die Bildung verschiedener proinflammatorischer Zytokine von Bedeutung und ist bei vielen Tumorerkrankungen erhöht. Die Genabschnitte vieler MMP werden von NF κ B reguliert ¹⁸.

In den letzten Jahren konnten wie beim MC auch für die CU spezifische Loci auf verschiedenen Chromosomen gefunden werden, die das Risiko einer Erkrankung erhöhen. Dies betrifft die Loci IBD 2 auf Chromosom 12q13, IBD 3 auf Chromosom 6p13 und IBD 6 auf Chromosom 19p13. Andere Loci liegen auf den Chromosomen 7q und 3p ²⁰.

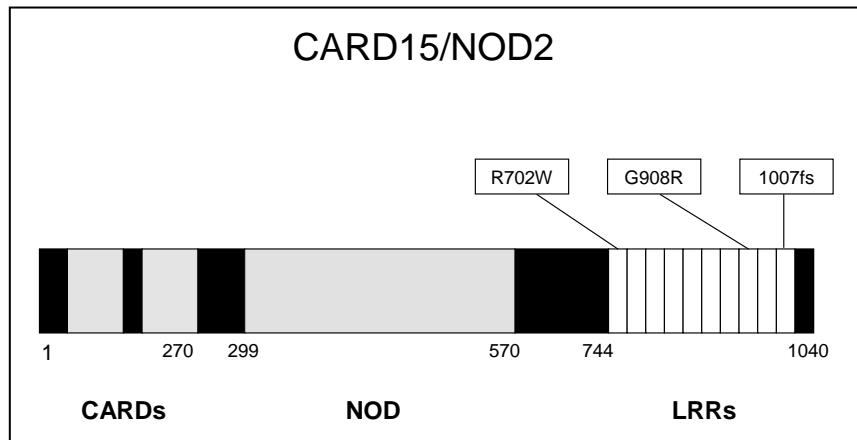


Abbildung 1: Aufbau des aus dem NOD2/CARD15 resultierenden Sensorproteins. Es besteht aus zwei CARDs (*caspase activation and recruitment domains*), einer NOD (*nucleotid-binding-oligomerisation-domain*) und zehn LRRs (*leucin rich repeats*). Die mit dem MC assoziierten Hauptmutationen des NOD2/CARD15-Gens sind angegeben. Modifiziert nach Mathew ¹⁵.

Das für die mukosale Barrierefunktion wichtige P-Glykoprotein-1 ist ein Produkt des Gens MDR1 auf Chromosom 7q. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Mäuse ohne MDR1a-Gen eine chronische Kolitis entwickeln ²¹. Eine niedrige Expression von P-Glykoprotein-1 beim Menschen durch einen Nukleotidpolymorphismus an Position C3435T des MDR1-Gens, führt zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko an einer CU ²².

Polymorphismen des intestinalen Muzin-Gens MUC3 erhöhen ebenfalls das Erkrankungsrisiko ²³.

Für die Entstehung der chronischen Entzündungsveränderungen der Darmschleimhaut spielt eine unkontrollierte und zu starke Immunantwort des Darmepithels auf das bakterielle Darmmilieu eine wichtige Rolle ²⁴. Bei der Reaktion des Immunsystems auf mikrobielle Antigene spielen "Toll-like receptors" (TLR) eine wichtige Rolle. Diese Rezeptoren sind unter anderem in der Lage, NF κ B zu aktivieren. Nach heutigem Wissen sind die TLR für die Aufrechterhaltung der intestinalen Epithelzellbarriere von entscheidender Bedeutung ¹⁵⁴. Eine hohe Genexpression des an der Glukokortikoid-synthese beteiligten Proteins LRH-1 konnte durch Modulierung der Immunantwort einen protektiven Effekt gegen das Auftreten einer CED zeigen ²⁶.

Das Zigarettenrauchen ist der bedeutendste Umweltfaktor bei CED. Mehrere Studien konnten zeigen, dass das Rauchen zu einer Symptomverbesserung bei einer CU führen kann. Beim MC mit Befall des terminalen Ileums dagegen, kann das Rauchen die Rezidivgefahr erhöhen²⁷.

2.1.3 Klinik und Diagnostik

Das klinische Bild der CU ist von blutig-schleimigen Durchfällen geprägt. Die Symptome variieren oft über einen längeren Zeitraum und können in der Startphase mit Gastroenteritiden infektiöser Genese verwechselt werden. Oft besteht ein schleichender Krankheitsbeginn und die Patienten haben bei Diagnosestellung manchmal über Jahre zurückgehende Symptome.

Kennzeichen der CU ist eine auf Mucosa und Submucosa begrenzte chronisch ulzerierende Entzündung der Darmschleimhaut, bei der verschiedene Mediatoren des Immunsystems eine Rolle spielen. Es kommt zu einer Infiltration mit Lymphozyten und Plasmazellen mit daraus resultierenden Kryptenabszessen und Kryptenatrophie. Bei langjährigen Verläufen kann es zu einer submukösen Fibrose kommen.

Die CU nimmt ihren Ausgangspunkt meistens im distalen Rektum, und kann sich bei einem Teil der Patienten im Krankheitsverlauf auf mehr proximale Darmabschnitte ausbreiten. Das Rektum ist daher immer betroffen. Bei ca. 50 % der Patienten ist ausschließlich das Rektosigmoid betroffen, bei 25 % besteht eine linksseitige Kolitis bis einschließlich zur linken Flexur. Bei weiteren 25 % ist das gesamte Kolon befallen. Man spricht dann von einer Pankolitis ulcerosa²⁸. Ein gleichzeitiges Vorliegen von Entzündungsveränderungen im terminalen Ileum bezeichnet man als "Backwash Ileitis". Eine Proktitis kann sich bei ca. 15 % der Patienten im weiteren Krankheitsverlauf nach proximal ausbreiten²⁹.

Bei schweren Krankheitsverläufen sind mehr als 20 Stühle pro Tag möglich. Diese sind oft mit krampfartigen Abdominalschmerzen (Tenesmen), perianalen Blutabgängen ohne Stuhl und besonders bei einer Proktitis mit Inkontinenzproblemen verbunden.

Im Krankheitsverlauf kann es zu einer bedeutenden Gewichtsabnahme kommen. Viele Patienten haben eine Eisenmangelanämie und bei schweren, bzw. septischen Verläufen Fieber und erhöhtes CRP.

Die schwerste Manifestationsform der CU ist das toxische Megakolon, bei dem typischerweise ein zuvor bestandener Durchfall sistiert, gefolgt von einem toxisch-septischen Krankheitsbild mit Fieber, Peritonitis und Tachykardie. Das toxische Megakolon ist mit einer Letalität von bis zu 30 % behaftet und bedarf akuter chirurgischer Behandlung mittels Kolektomie ³⁰.

Extraintestinale Symptome finden sich bei der CU seltener als beim MC. Es kann dort aber auch zu einer Augenbeteiligung in Form einer Episkleritis oder Uveitis kommen. Gelenkschmerzen können Ausdruck einer Arthritis oder eines Morbus Bechterews sein. Desweiteren kann ein Erythema nodosum oder Pyoderma gangraenosum auftreten.

Diese sekundären extraintestinalen Symptome werden bei Ansprechen auf die antiinflammatorischen Behandlung oder nach Kolektomie besser bzw. verschwinden ganz.

Die fast ausschliesslich mit der CU assoziierte primär sklerosierende Cholangitis (PSC) ist eine primäre extraintestinale Manifestation und ihr Verlauf ist unabhängig vom Grad der Entzündung des Kolons. Sie ist durch eine Erhöhung der alkalischen Phosphatase und der gamma-GT samt typischen perlschnurartigen Veränderungen in den intra- und extrahepatischen Gallenwegen gekennzeichnet.

In der Labordiagnostik gibt es bis heute keine Marker, die für die CU spezifisch sind. Entzündungs- und Infektionsparameter mit CRP, Blutkörperkenkung (BKS) und Blutbild können pathologische Veränderungen aufzeigen. Bei den meisten Verlaufsformen haben Patienten trotz bedeutender endoskopischer Veränderungen allerdings normale Laborwerte.

Bei der CU stellt die endoskopische Untersuchung mittels Koloskopie das beste diagnostische Mittel dar. Endoskopisch findet man für die Erkrankung typische Schleimhautveränderungen mit verminderter Gefäßzeichnung, Erythem, Erosionen und Ulzerationen (Abb. 2 auf S. 14). Typisch sind die durch die chronische Entzündung und intermittierenden Regenerationsphasen entstehenden Pseudopolypen.

Im fortgeschrittenen Stadium kommt es zu einem Verlust der, normalerweise vorhandenen, Haustrierung der Darmwand. Dadurch erhält das Kolon ein Fahrradschlauch-ähnliches Aussehen.

Die Entzündungsveränderungen erstrecken sich, im Gegensatz zum MC, meistens kontinuierlich von distal nach proximal und sind oft distal am stärksten ausgeprägt.

Die klinische und histologische Abgrenzung zum MC kann schwierig sein. Im Rahmen der Koloskopieuntersuchung werden von allen Darmabschnitten Gewebeproben (Biopsien) entnommen und histologisch untersucht. Dabei können auch in makroskopisch unauffälligen Darmabschnitten histologisch nachweisbare Entzündungsveränderungen vorliegen.

Um speziell bei Krankheitsbeginn eine infektiöse Genese auszuschließen, ist eine Stuhluntersuchung auf darmpathogene Bakterien wie Salmonellen, Shigellen, Yersinia und Campylobakter sowie auf Clostridium difficile notwendig.

Andere wichtige Differentialdiagnosen sind die Strahlenkolitis, ischämische Kolitis bei Gefäßerkrankungen, NSAID-assoziierte Kolitis und die Kolitis im Rahmen einer Divertikulitis.

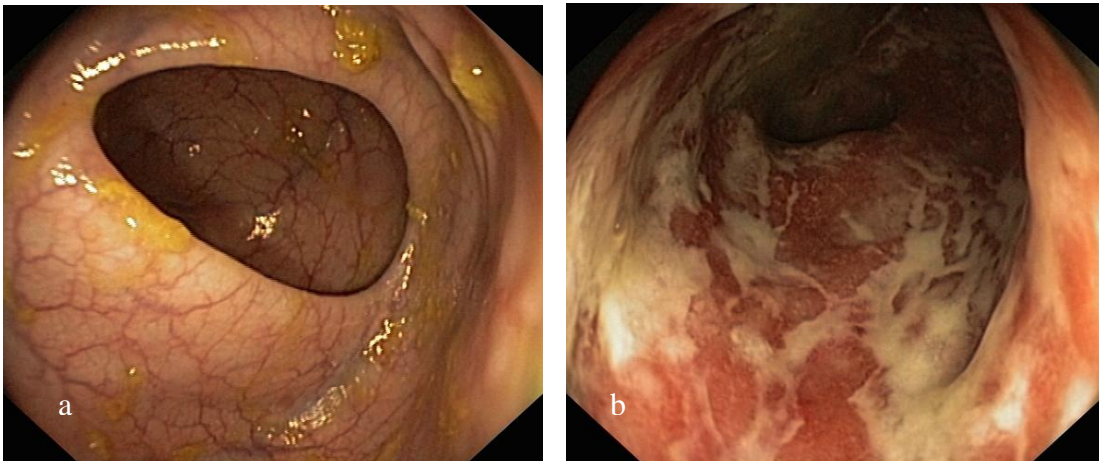


Abbildung 2: Endoskopisches Bild der Colitis ulcerosa. a Normale Darmschleimhaut. **b** CU mit Schleimhautödem und multiplen fibrinbedeckten Ulzerationen. Endoskopisches Bild einer starken Entzündung. J Halwe 2008

Bei immunkomprimierten Patienten, wie z.B. bei HIV-Infektionen und unter medikamentöser immunsuppressiver Behandlung, kann eine Infektion mit dem Cytomegalievirus ein ähnliches klinisches Bild zeigen.

Typische histopathologische Veränderungen der CU ³¹:

- Störung der Kryptenarchitektur
- Kryptenatrophie, Kryptenabszesse
- Plasmozytose im basalen Schleimhautstroma
- Infiltration der Mucosa mit Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen
- Flache Ulzerationen mit Muzinverlust.

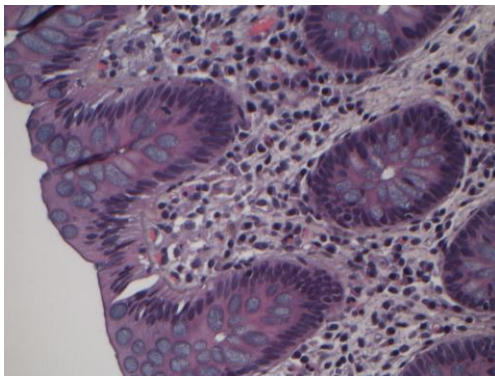


Bild 1. Normale Darmschleimhaut

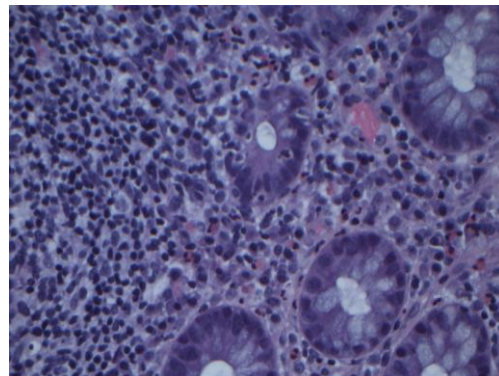


Bild 2. CU mit leichter Entzündung. Infiltration von Plasmazellen und Granulozyten.

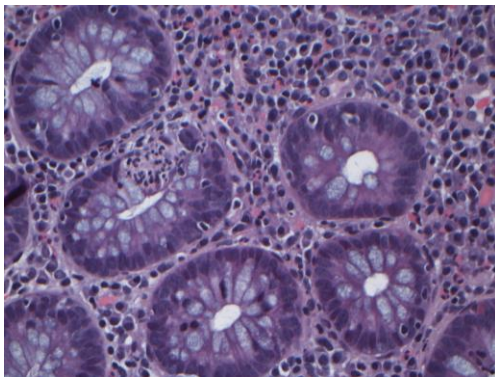


Bild 3. CU mit moderater Entzündung. Infiltration der Lamina Propria mit Granulozyten, reduzierte Anzahl von Becherzellen.

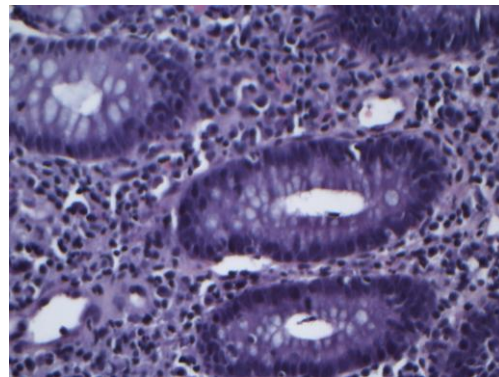


Bild 4. CU mit starke Entzündung. Starke Infiltration der Lamina Propria, Destruktion einzelner Krypten.

Abbildung 3: Beispiele histologischer Schnitte von Patienten mit CU. Die Biopsate stammen von Patienten dieser Studie.

2.1.4 Colitis ulcerosa und Malignität

Der Zusammenhang zwischen der CU und dem kolorektalen Karzinom (KRK) wurde erstmals 1925 von Crohn und Rosenberg beschrieben ¹. Im Vergleich zur Normalbevölkerung haben Patienten mit einer CED ein bis zu 20-fach erhöhtes Risiko für die Entstehung eines KRK. Sie sind im Durchschnitt 10 bis 20 Jahre jünger als Patienten mit einem sporadischen KRK.

Das erhöhte Karzinomrisiko konnte durch eine Vielzahl an Studien bestätigt werden. Dabei ist das Karzinomrisiko von der anatomischen Ausbreitung der Erkrankung, der Krankheitsdauer und von der Entzündungsaktivität abhängig. Patienten mit einer Pankolitis haben mit Abstand das größte Karzinomrisiko. Nach 10-jähriger Krankheitsdauer beginnt das Karzinomrisiko anzusteigen. Mehrere Studien zeigten eine kumulative Inzidenz des KRK bei CU von 2,1 % nach 10 Jahren, 5-10 % nach 20 Jahren und 12-20 % nach 30 Jahren Krankheitsdauer ^{2,32,33,34}.

Eine auf das Rektum begrenzte Entzündung (Proktitis) führt dagegen nicht zu einem erhöhten Malignitätsrisiko ³⁵. Bei einer linksseitigen CU steigt das Karzinomrisiko ca. 10 Jahre später an als bei der Pankolitis ³⁶. Das gleichzeitige Vorliegen einer primär sklerosierenden Cholangitis führt zu einer weiteren Erhöhung des Karzinomrisikos um das fünffache ³⁷.

2.1.4.1 Klinisches Bild von Dysplasien und Karzinomen

Die Entwicklung des KRK bei CED zeigt Unterschiede in der Pathogenese im Vergleich zur Entwicklung eines KRK bei Patienten ohne CED. Aufgrund der vorliegenden Kolitis sind viele Frühsymptome des KRK wie z.B. perianale Blutungen und Veränderungen in der Stuhlbeschaffenheit schwer zu erkennen.

Bei Patienten ohne CED entsteht ein KRK fast immer aus Polypen, die endoskopisch gut zu diagnostizieren und meist in der linken Kolonhälfte lokalisiert sind ³⁸. Prämaligne Dysplasieveränderungen begrenzen sich dabei in der Regel auf das polypöse Gewebe.

Im Rahmen einer CED können dagegen multiple flache Dysplasien im gesamten Kolon auftreten und sind endoskopisch oft schwer zu entdecken. Sie entstehen in

Darmabschnitten mit vorliegender chronischer Entzündung und sind deshalb sowohl makroskopisch als auch histologisch schwer zu diagnostizieren.

Dysplasieveränderungen, die sich auf Plaque-ähnlichen Schleimhauterhöhungen befinden, werden als DALM (*dysplasia-associated lesion or mass*) bezeichnet. Unter diesen Plaques können invasive KRK sitzen, die mittels endoskopischer Biopsie schwer zu erreichen sind. Beim Vorliegen einer DALM besteht ein erhöhtes Risiko für synchrone maligne Neoplasien ^{39,40}. Der Nachweis einer DALM ist deshalb nach entsprechender Verifizierung eine Indikation zur Kolektomie. Polypöse Läsionen in Darmabschnitten ohne Inflammation werden als ALM (*adenoma-like lesion or mass*) bezeichnet und sind nicht mit einem erhöhten Karzinomrisiko assoziiert.

Bei Patienten, die aufgrund einer nachgewiesenen LGD (*low grade dysplasia*) kolektomiert wurden, lagen in 19 % synchrone maligne Neoplasien oder HGD (*high grade dysplasia*) vor. Bis zu 50 % von Patienten mit nachgewiesener LGD entwickelten im Laufe von fünf Jahren eine HGD oder ein KRK ⁴⁴. Patienten mit einer diagnostizierten HGD besitzen ein Risiko von bis zu 40 % für das Vorliegen einer synchronen neoplastischen Veränderung. DALMs sind mit einem ähnlich hohen Risiko assoziiert.

Beim MC steigt das Risiko für die Entstehung von intestinalen Neoplasien ebenfalls mit zunehmender Erkrankungsdauer und Ausdehnung an. Studien haben ein bis zu 20-fach erhöhtes Karzinomrisiko bei ausgedehnter Kolitis gezeigt ^{41,42}. In anderen Studien fand man bedeutend geringere Inzidenzen für ein KRK ⁴³.

2.1.4.2 Histopathologische Einteilung von Dysplasien

Histologisch teilt man Dysplasieveränderungen entsprechend einer standardisierten Klassifikation nach Ridell ein ⁴⁵. Früher wurde ein dreistufiges Dysplasiestaging benutzt, aktuell werden die leichten und mittelgradigen Dysplasien zu geringgradigen Dysplasien (low grade dysplasia = LGD) zusammengefasst.

Klassifikation von Dysplasien bei CED (nach Ridell):

1. Negativ
2. Unsicher
3. Positiv
 - Low Grade Dysplasia (LGD)
 - High Grade Dysplasia (HGD)

Die Diagnose muss von einem zweiten erfahrenen Pathologen bestätigt werden. Aufgrund des gleichzeitigen Vorliegens von Entzündungsveränderungen ist die histopathologische Beurteilung und Klassifikation von intraepithelialen Dysplasieveränderungen sehr schwierig und stellt hohe Anforderungen an den Pathologen.

2.1.4.3 Kolorektale Karzinogenese

In der Ätiologie von Neoplasien beim Vorliegen einer CED bestehen wichtige Unterschiede im Vergleich zum sporadischen KRK. Die Entwicklung zum sporadischen KRK verläuft über die Transformation eines Adenoms, über geringgradige und hochgradige Dysplasie, zum Karzinom ⁴⁶. Dabei steht die Inaktivierung des APC (*Adenomatosis Polyposis Coli*)-Tumorsuppressor-Gens auf Chromosom 5q21 am Anfang der Adenom-Karzinom-Sequenz (siehe Abb. 4 auf S. 20). Das Produkt dieses Gens spielt für die Zellproliferation eine wichtige Rolle ⁴⁷. Eine Mutation des APC-Gens konnte bei bis zu 50 % der Patienten mit KRK nachgewiesen werden ⁴⁸. In malignen Zellen des Kolons konnte eine erhöhte Expression von β -Katenin festgestellt werden. Diese kann entweder aus einer Mutation des β -Katenin-Gens oder durch Hochregulierung der Genexpression erfolgen. Eine Erhöhung von β -Katenin scheint in der

frühen Karzinogenese von Bedeutung zu sein ¹⁶⁰. Des weiteren kommt es häufig in der Frühphase der Karzinogenese zu einer Hypomethylierung des Genoms. Durch den Verlust von Methylgruppen der DNA wird das Genom instabiler und ist anfälliger für pathologische Veränderungen ⁴⁹.

In ca. 50 % aller kolorektalen Karzinome und in großen Adenomen lässt sich eine Aktivierung des *k-ras* Onkogens auf Chromosom 12p nachweisen ⁵⁰. Im weiteren Verlauf kann es zu einer Genmutation des DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*)-Gens auf Chromosom 18q21 kommen, was zu einer Beschleunigung des Adenomwachstums führt. Diese DCC-Mutation ist in mehr als 70 % der kolorektalen Karzinome und 50 % der späten Adenome nachweisbar ⁴⁸.

Erst spät, im fortgeschrittenen Adenomstadium mit Dysplasie induzieren Mutationen des p53 Tumorsuppressorgens die Transformation in ein invasives Karzinom. Eine p53-Mutation ist in mehr als 50 % aller KRK zu finden ⁵¹.

Ca. 20 % der spontanen KRK entstehen durch Mikrosatelliten-Instabilitäten ⁵². Durch Mutationen in den MMR (*Mismatch-Repair*)-Genen kann die Reparatur von Replikationsfehlern unterbleiben und daraus eine Instabilität vor allem der hochrepetitiven DNA-Abschnitte wie den Mikrosatelliten entstehen. Die Weitergabe der falsch eingebauten Nukleotide kann zu Funktionsverlusten der betroffenen Gene führen.

Beim CED-assoziierten KRK dagegen steht die p53-Mutation am Anfang der Karzinogenese und kann schon in nicht dysplastisch veränderter Schleimhaut vorkommen. Die Inaktivierung des APC-Gens geschieht meist erst im letzten Stadium beim Übergang zum malignen KRK. Die Entstehung des KRK verläuft dabei oft nicht so systematisch wie beim sporadischen KRK über die Entwicklungsstufen vom Adenom zum Karzinom. Vielmehr kann das KRK direkt aus normaler oder dysplastisch veränderter Schleimhaut entstehen ⁵³. Mutationen im p53-Gen, Mikrosatelliten-Instabilität und veränderte DNA-Methylierung können schon in nicht dysplastischer Schleimhaut nachgewiesen werden ⁵⁴. Diese Veränderungen treten bei der Entwicklung des spontanen KRK wie erwähnt erst spät auf.

Der Einsatz von 5-ASA-Präparaten als entzündungshemmende Medikamente hat die Inzidenz von intestinalen Neoplasien bei CU deutlich reduziert ⁵⁵. Das unterstützt die Theorie, dass eine aktive chronische Entzündung zur Karzinogenese beiträgt.

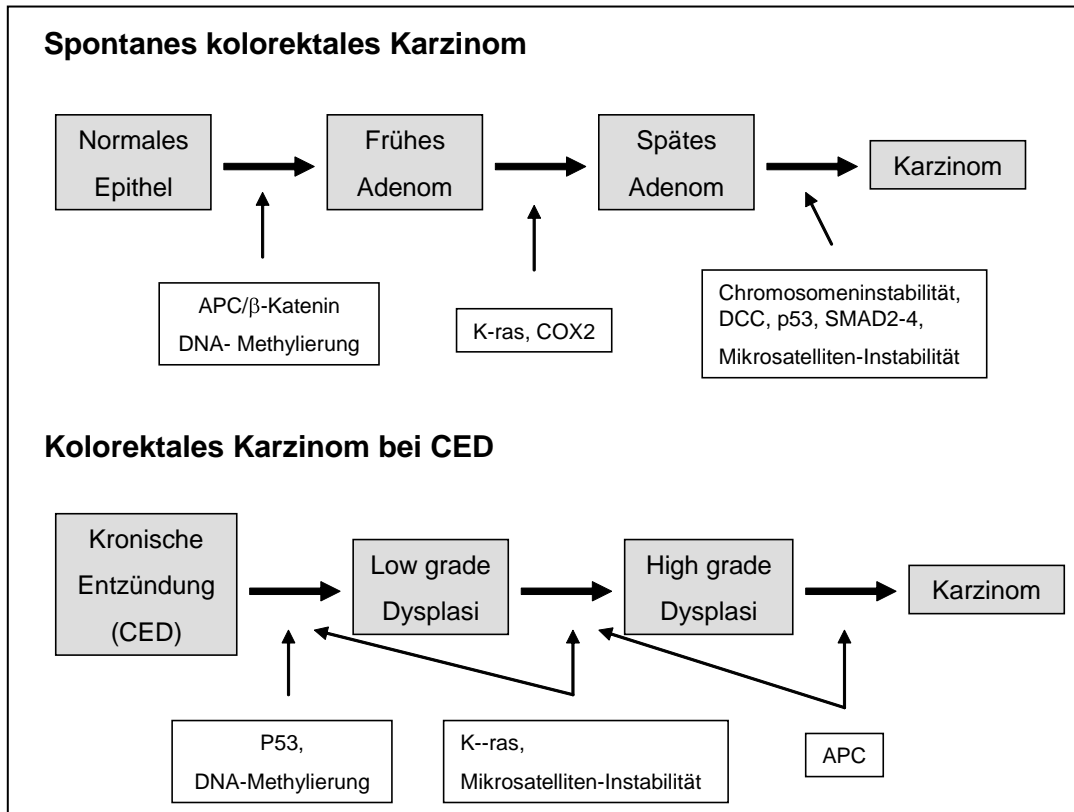


Abbildung 4: Modell der kolorektalen Karzinogenese bei Vorliegen einer CED im Vergleich zum spontanen KKR. Beim spontanen kolorektalen Karzinom verläuft die Karzinomentstehung über die Adenom-Karzinom-Sequenz. Die Inaktivierung des APC-Gens stellt den initialen Schritt dar, die Mutation des p53-Gens führt zum Übergang in malignes Wachstum. Die Mutation des p53-Gens steht dagegen am Anfang der Karzinogenese im Rahmen einer CED und führt zur Dysplasie. Durch die Mutation des APC-Gens erfolgt dann der Übergang zum Karzinom. Modifiziert nach Graham ¹⁴⁰.

2.1.5 Calprotektin

Calprotektin ist ein kalziumbindendes Protein und gehört zur S100 Proteinfamilie. Es wird hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten, aber auch von Monozyten und Makrophagen gebildet.

Funktionell hat Calprotektin bakteriostatische Eigenschaften und man vermutet, dass Calprotektin zur Regulierung der Darmflora beiträgt¹⁵⁸. Calprotektin bindet Zink und Kalzium, wobei Kalzium zur Stabilisierung der Proteinstruktur beiträgt⁵⁸. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Calprotektin Metalloproteinasen hemmen und in Zellkulturen eine Erhöhung der Apoptoserate induzieren kann⁵⁶.

Der Plasmaspiegel kann bei Infektionen oder Entzündungen auf ein Vielfaches ansteigen. Im Stuhl entspricht die Calprotektinkonzentration ca. dem sechsfachen der Plasmakonzentration⁵⁷. Ein erhöhtes Calprotektin im Stuhl ist die Folge der Migration neutrophiler Granulozyten durch eine entzündete Darmschleimhaut in das Lumen des Gastrointestinaltraktes. Dabei korreliert die fäkale Calprotektin-Konzentration mit der endoskopisch und histologisch gefundenen Entzündungsaktivität bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen⁵⁸.

Der Stuhl gesunder Personen enthält weniger als 50 mg/kg Calprotektin. Bei Patienten mit aktiver CED findet man oft deutlich erhöhte Werte über 500 mg/kg. Calprotektin ist demnach ein guter Entzündungsmarker⁵⁷.

Studien haben gezeigt, dass man mit einem oberen Referenzwert von 150 mg/kg mit einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 90 % zwischen einer CED und einem Reizdarmsyndrom unterscheiden kann⁵⁹.

Differentialdiagnostisch kann das fäkale Calprotektin bei intestinalen Polypen und Neoplasien, gastrointestinalen Infektionen und Halsinfektionen erhöht sein.

2.2 Matrix Metalloproteinasen

2.2.1 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) bildet den Hauptbestandteil des extrazellulären Raumes, der zusammen mit den organspezifischen Zellen das menschliche Gewebe bildet. Speziell das Bindegewebe besitzt einen hohen Anteil an EZM⁶⁰. Die EZM besteht gewebe-spezifisch aus einer Vielzahl von Makromolekülen, die im Bindegewebe von Fibroblasten und höher organspezifisch spezialisierten Zellen wie Chondroblasten und Osteoblasten, sezerniert werden. Funktionell werden sie in die Gruppe der Proteoglykane und die Gruppe der Faserproteine eingeteilt.

Die *Proteoglykane* (z.B. Aggrecan, Perlecan und Decorin) setzen sich aus Proteinen und Glykosaminoglykanen (Polysacchariden) zusammen. Die Glykosaminoglykane kann man in die Untergruppen Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Dermatansulfat, Heparansulfat und Heparin, sowie Keratansulfat einteilen.

Die wässrige Phase der Polysaccharide ermöglicht die Diffusion von Nährstoffen und Hormonen zwischen Blut und Gewebe. Aufgrund der hohen Konzentration ihrer negativen Ladungen können sie osmotisch wirkende Kationen, wie z.B. Na^+ anziehen.

Die *Faserproteine* lassen sich nach ihrer jeweiligen Funktion in Strukturproteine wie Kollagen und Elastin, sowie in Adhäsionsproteine wie Fibronectin und Laminin unterteilen. Der Hauptbestandteil der EZM ist das Kollagen der Typen I bis IV. Die Kollagene sind für den Aufbau der Organe und ihrer Festigkeit von großer Bedeutung.

Die die EZM begrenzende Basalmembran wird hauptsächlich von Typ IV-Kollagen gebildet. Weitere Bestandteile der EZM sind Wachstumsfaktoren mit ihren Transportproteinen und andere bioaktive Moleküle. Die Funktionen der EZM sind in Tab. 1 auf S. 23 dargestellt.

Mechanische Funktionen	Stützfunktion Formgebung der Organe Filterfunktion Diffusionsbarriere
Beeinflussung von Zelleigenschaften	Proliferation Migration Adhäsion Phänotyp
Speicherfunktion	Bindung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren

Tabelle 1: Die Funktionen der EZM, modifiziert nach Ortega ⁶²

In nicht-proliferativen, gesunden Geweben besteht ein Gleichgewicht zwischen dem Auf- und Abbau der Komponenten der EZM, dem sogenannten *tissue remodeling*. Der Abbau (Degradation) der EZM spielt bei vielen physiologischen Prozessen wie der Embriogenese, dem Wachstum und der Wundheilung eine entscheidende Rolle ³. Bei vielen pathologischen Prozessen, wie der rheumatoiden Arthritis und der Parodontose, ist die Degradation der EZM ebenfalls erhöht ⁶¹.

Die Degradation erfolgt durch verschiedene Proteasen (Serin-/Threoninproteasen, Cysteinproteinasen, Aspartatproteinasen und MMPs) sowie durch Phagozytose. Die MMPs können als einzige Enzyme nahezu alle Bestandteile der EZM abbauen und nehmen dadurch eine zentrale Position ein.

2.2.2 Familie der Matrix Metalloproteinasen

MMPs sind eine Familie zinkabhängiger Endopeptidasen, die eine zentrale Funktion in der Degradation der EZM und damit beim physiologischen und pathologischen Gewebeumbau einnehmen (siehe Tab. 2 auf S. 24).

Das erste Matrix Metalloprotein (MMP-1) wurde 1962 von Gros und Lapiere als das Enzym beschrieben, welches den Abbau des Schwanzes bei der Kaulquappe durch Degradation der kollagenen Trippelhelix bewirkt ⁶³.

Die Bezeichnung und Numerierung der ersten MMPs wurde 1989 auf dem Destin Beach Matrix Metalloproteinase meeting festgelegt ⁶⁴. Zu der Gruppe der humanen MMPs

gehören heute mindestens 26 zinkabhängige Endopeptidasen, die aufgrund ihrer Substratspezifität in folgende Gruppen eingeteilt werden:

- Kollagenasen (Typ I-Kollagenasen)
- Gelatinasen (Typ IV-Kollagenasen)
- Stromelysine
- Membranständige MMPs
- Matrilysine
- Nicht klassifizierte MMPs

Physiologische Prozesse	Pathologische Prozesse
Ovulation	Invasion von Krebszellen
Embryogenese	Tumormetastasierung
Knochenwachstum	Colitis ulcerosa
Angiogenese	Morbus Crohn
Zahnwachstum	Rheumatoide arthritis
Makrophagen-Funktion	Osteoarthritis
Neutrophilen-Funktion	Periodontale Krankheiten
Wundheilung	Leberzirrhose
Frakturheilung	Korneaulzerationen
Nervenzellenwachstum	Ulcus ventrikuli
Endometrialer Zyklus	Dilatierte Kardiomyopathie
Haarfollikel-Zyklus	Aortaaneurysma
Apoptose	Atherosklerose
	Epidermiolysis bullosa
	Nephritis
	Fibrotische Lungenerkrankungen
	Lungenemphysem

Tabelle 2: MMP-beeinflusste Funktionen der physiologischen und pathologischen Tissue-Resorption und Degradation. Revidiert nach Nagase⁶⁵.

2.2.3 Domänenstruktur der Matrix Metalloproteinasen

MMPs bestehen aus einer katalytischen Domäne mit einer hochkonservierten Zinkbindenden Region, einem Signalpeptid, einer Propeptidregion und, mit Ausnahme von MMP-7, MMP-23 und MMP-26, aus einer Hämoexindomäne (Abb. 5). Die sogenannten membranständigen MMPs (MT-MMPs) besitzen zusätzlich eine Transmembran- und eine zytoplasmatische Domäne ⁶⁶.

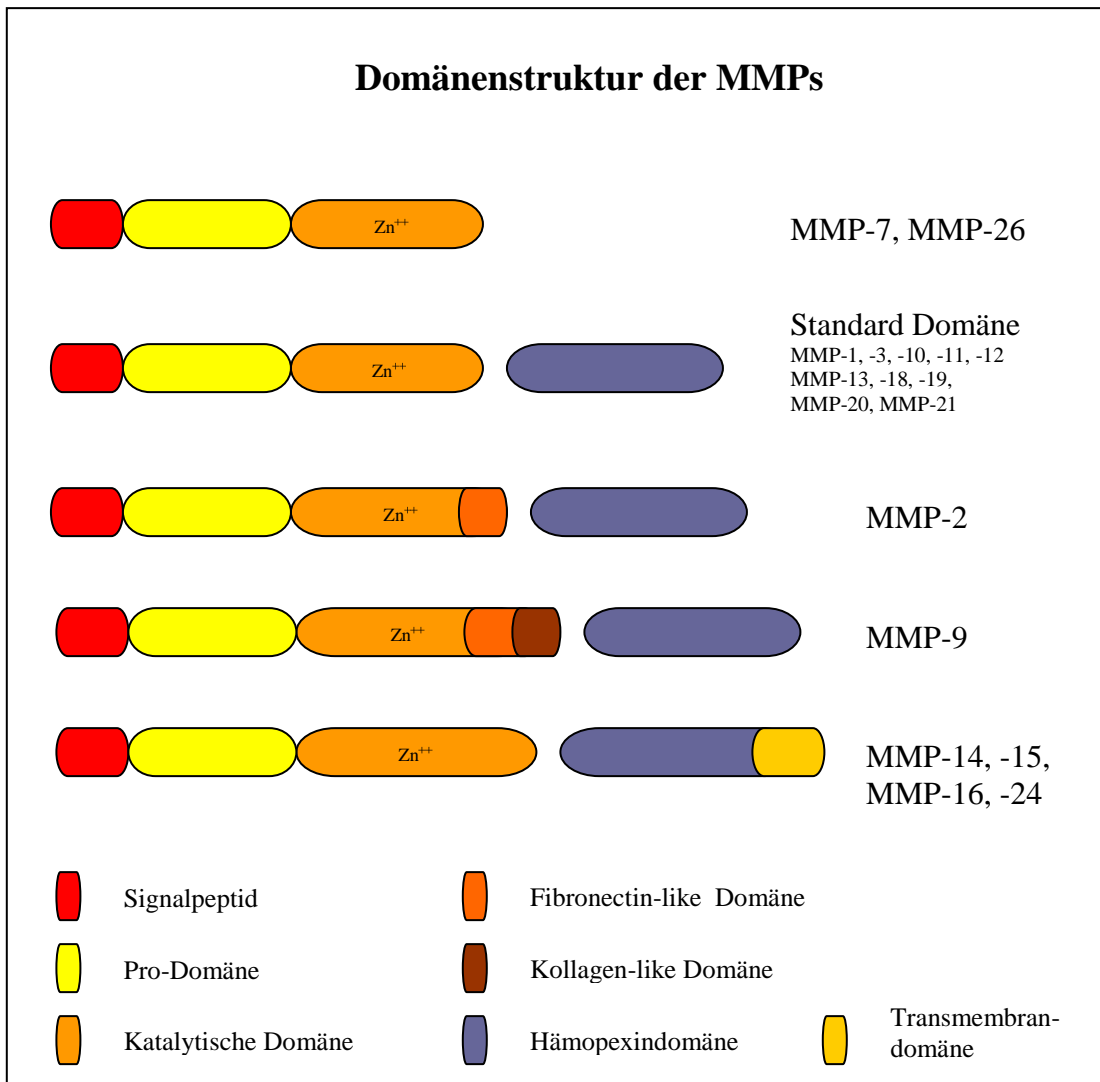


Abbildung 5: Domänenstruktur der Matrix Metalloproteinasen. Modifiziert nach Hemmann et al. ¹³⁸.

Das Signalpeptid

Das Signalpeptid setzt sich aus 17-20 hydrophoben Aminosäuren zusammen. Es ist für die Abgabe der intrazellulär gebildeten MMPs in das endoplasmatische Retikulum von Bedeutung. Von dort erfolgt die Sezernierung in den extrazellulären Raum. MMP-17 sowie MMP-21 bis MMP-23 besitzen kein Signalpeptid ⁶⁷.

Das Propeptid

An das Signalpeptid ist ein Propeptid gebunden. Es besteht aus ca. 80 Aminosäuren mit einem hydrophoben Rest am N-terminalen Ende. Die hochkonservierte Region mit der Autoinhibitorsequenz PRCXXPD befindet sich in der Nähe des C-terminalen Endes. Das in ihr enthaltene Cystein ist mit Hilfe einer Thiol-Gruppe genau gegenüber dem Zinkion des aktiven Zentrums der katalytischen Domäne positioniert und nimmt dessen vierte Bindungsstelle ein. Die Cystein-Zink-Bindung wird auch als *Cystein-switch* bezeichnet. Durch diesen Cystein-switch wird das aktive Zentrum blockiert, so dass die MMP in ihrer inaktiven Form vorliegt. Durch den Cystein-switch wird das zur Katalyse notwendige Wassermolekül verdrängt ⁶⁸. Die Aktivierung der MMPs erfolgt durch die Abspaltung des Propeptids ⁶⁹.

Die katalytische Domäne

Die katalytische Domäne enthält das für die enzymatische Aktivität der MMPs zuständige katalytisch wirkende Zinkion und Bindungsstellen für Kalzium. Es setzt sich aus ca. 170 Aminosäuren zusammen. Das Zinkion befindet sich am C-terminalen Ende der katalytischen Domäne und wird dort durch drei Histidinreste und einen Cysteinrest stabilisiert ⁷⁰.

Die Hinge Region

Die Hämopexindomäne ist bei allen MMPs mit Ausnahme der Matrilysine mit der katalytischen Domäne über eine sogenannte „Hinge region“ verbunden. Diese Region ist bei den verschiedenen MMPs von varrierender Größe und hat für die Substratspezifität der MMPs eine Bedeutung. Die Hinge Region kann die jeweiligen Substrate entweder selbst binden oder eine Bindung an die anderen Domänen unterstützen ⁷¹.

Die Hinge Region wird je nach MMP von 2 bis 75 Aminosäuren gebildet und ist reich an Prolin. Da MMP-7 und MMP-26 keine Hämapexin-ähnliche Domäne besitzen, haben sie auch keine Hinge Region. MMP-9 besitzt die längste Hinge Region.

Die Hämapexin-ähnliche Domäne

Die Hämapexin-ähnliche Domäne besteht aus vier gleich aufgebauten Abschnitten aus jeweils 48 Aminosäuren. Sie tragen jeweils einen Cysteinrest an ihren Enden, der durch Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten wie ein vierblättriger Propeller angeordnet sind ⁷². Ihre Ähnlichkeit zu dem Protein Hämapexin führte zur Namensgebung. Die Hämapexin-ähnliche Domäne trägt zur Substratspezifität und Bindung der TIMP, der Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases, bei und ist so an der Regulation der MMPs beteiligt ⁶⁶. Den Matrilysinen MMP-7 und MMP-26 fehlt diese Domäne.

Die Fibronektin-ähnliche Domäne

Die Gelatinasen A und B besitzen als einzige MMPs innerhalb ihrer katalytischen Domäne eine dreifache Wiederholung einer 58 Aminosäuren langen Fibronektin Typ II-ähnlichen Sequenz. Diese ist für die Substratspezifität der Gelatinasen von Bedeutung ⁷³.

Die Transmembran- und die cytoplasmatische Domäne

Bei den membranständigen Matrix Metalloproteinasen (MT-MMPs) ist am C-terminalen Ende zusätzliche eine aus 80 bis 110 Aminosäuren bestehende Transmembrandomäne vorhanden. Ca. 20 Aminosäuren dieser Sequenz verankern die MT-MMPs in der Zellmembran. Im Inneren der Zelle schließt sich die cytoplasmatische Domäne an die Transmembrandomäne an. Diese Verankerung wird als Typ-I-membranständig bezeichnet.

Die MMPs -17 und -25 sind über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) mit der Zellmembran verbunden und werden deshalb als Typ II-membranständige MMPs bezeichnet.

2.2.4 Übersicht der Matrix Metalloproteinasen

Heute sind mindestens 26 MMPs beim Menschen bekannt und diese werden aufgrund ihrer Struktur und den in vitro bestimmten Substratspezifitäten in Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13), Gelatinasen (MMP-2, MMP-9), Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11), Matrilysine (MMP-7, MMP-26), „Membrane-type“ (MT)-MMPs (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25) und andere MMPs (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27, MMP-28) eingeteilt ¹⁵⁵.

Die Kollagenasen spalten hauptsächlich Kollagene vom Typ I bis IV und initiieren damit die Degradation von fibrillären Kollagen. Die dadurch entstehenden Abbauprodukte wiederum werden durch andere MMPs, wie z.B. die Gelatinasen, weiter abgebaut.

Tab. 3 gibt eine Übersicht über die verschiedenen MMPs, ihre Substrate und die Zellen, von denen sie exprimiert werden.

MMPs werden unter anderem von Fibroblasten, Entzündungszellen, Endothelzellen und Epithelzellen exprimiert. Zusätzlich konnte die Expression von MMPs in verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen werden. Im gesunden Gewebe sind die meisten MMPs nur in geringen Mengen nachweisbar.

Humane Matrix Metalloproteinasen und ihre Substrate			
MMP	Herkömmlicher Name	Substrat	Produzierende Zellen
MMP-1	Interstitielle Kollagenase 1	Kollagene I, II, III, VII, VIII, X, Gelatine, Aggrekan, Myelinbase-Protein, proTNF- α , MMP-2, MMP-9, IL-1 β , L-Selektin, Casein, α_1 -Antitrypsin, Ovostatin.	Tumorzellen (Mamma, Kolon, Prostata), Fibroblasten, Entzündungszellen
MMP-2	Gelatinase A	Kollagene I, IV, V, VII, X, XI, XIV, Gelatine, Elastin, Laminin, Fibronectin, Aggrekan, Myelinbase-Protein, B Amyloid, proTNF- α , MMP-9, MMP-13	Tumorzellen (Mamma, Kolon, Lunge, Prostata, Pankreas, Ovarien), Fibroblasten, Endothel
MMP-3	Stromelysin-1	Kollagene II, IV, IX, XI, X, Gelatine, Perlecan, Fibronectin, Laminin, Elastin, Ovostatin, Myelinbase-Protein, proTNF- α , pro-MMP-1, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9, pro-MMP-13	Tumorzellen (Mamma, Kolon, Lunge, Prostata, Pankreas), Fibroblasten, Endothel.
MMP-7	Matrilysin 1 PUMP-1	Kollagene IV, X, Gelatine, Aggrekan, Fibronectin, Laminin, Elastin, Defensin, Proteoglykan, Plasminogen, Myelinbase-Protein, proTNF- α , pro-MMP-1, pro-MMP-2, pro-MMP-9, MMP/TIMP-1-Kpl.	Tumorzellen (Mamma, Kolon, Lunge, Prostata), Fibroblasten, Endothel

MMP-8	Neutrophile Kollagenase 2	Kollagene I, II, III, V, VII, VIII, X, Gelatine, Aggrecan, Fibronectin, α_2 -Antiplasmin	Tumorzellen (Mamma)
MMP-9	Gelatinase B	Kollagene IV, V, VII, X, XIV, Gelatine, Elastin, Aggrecan, Versican, Nidogen, Proteoglykan-Link-Protein, Fibronectin, Myelinbase-Protein, proTNF- α , α_1 -Proteinase-Inhibitor	Tumorzellen (Mamma, Kolon, Lunge, Prostata, Pankreas, Ovar), Endothel, Epithelzellen, Entzündungszellen
MMP-10	Stromelysin 2	Kollagene, III, IV, V, Gelatine, Laminin, Aggrecan, Elastin, Fibronectin, pro-MMP-1, pro-MMP-8	Fibroblasten
MMP-11	Stromelysin 3	α_1 -Proteinase-Inhibitor, α_1 -Antitrypsin, Laminin	Tumorzellen (Mamma, Kolon, Lunge), Fibroblasten
MMP-12	Metalloelastase Makrophagen-elastase	Kollagen IV, Gelatine, Fibronectin, Elastin, Insulin (β -Kette), Laminin, proTNF- α , Myelinbase-Protein	Epitheliale Hauttumoren
MMP-13	Kollagenase 3	Kollagene I, II, III, IV, Gelatine, Aggrecan, pro-MMP-9, pro-MMP-13	Tumorzellen (Mamma) Endothelzellen
MMP-14	Membran-Type 1 -MMP	Kollagene I, II, III, Gelatine, Aggrecan, Fibrin, Fibronectin, Laminin, Nidogen, proTNF- α , pro-MMP-2, pro-MMP-13	Tumorzellen (Mamma, Lunge, Pankreas, Ovar)
MMP-15	Membran-Type 2 -MMP	Kollagene I, II, III, Gelatine, Aggrecan, Fibronectin, Laminin, Nidogen, pro-MMP-2, pro-MMP-13	
MMP-16	Membran-Type 3 -MMP	Kollagene I, III, Gelatine, Aggrecan, Kasein, Fibronectin, Laminin, pro-MMP-2, pro-MMP-13	
MMP-17	Membran-Type 4 -MMP	Gelatin, Fibrin, Fibronectin	
MMP-19	RASI-1	Kollagene I, IV, Gelatin, Aggrecan, Kasein, Fibronectin, Laminin, Nidogen	Plazenta, Lunge
MMP-20	Enamelysin	Aggrecan, Amelogenin	Odontogene Tumoren
MMP-21		α_1 -Antitrypsin	
MMP-23	CA-MMP	Gelatine	Ovarien, Testis, Prostata
MMP-24	Membran-Type 5 -MMP	Gelatine, Fibronectin, Dermatin-Sulfat, pro-MMP-2, pro-MMP-13	
MMP-25	Leukolysin Membran-Type 6 -MMP	Kollagen IV, Gelatine, Fibrin, Fibronectin, pro-MMP-2	Tumorzellen (Kolon, Astrozytome, Glioblastome)
MMP-26	Matrilysin 2 Endometase	Kollagen IV, Gelatine, Kasein, Fibrogen, Fibronectin, β_1 -Proteinase-Inhibitor	Uterus, Plazenta
MMP-28	Epilysin	Kasein	Lunge, Gehirn, Darm, Muskulatur, Niere, versch. Tumorgewebe

Tabelle 3. Übersicht über die Humanen Matrix Metalloproteinasen und ihrer Substrate. *TNF- α* = Tumor Necrosis Factor alpha, *Kpl.* = Komplex.

Modifiziert nach Sommerville et al.⁷⁴

2.2.5 Die Regulation der Matrix Metalloproteinasen

Die Regulation der MMPs erfolgt durch Transkription, Aktivierung und Hemmung (Inhibition). Nach ihrer Sekretion in die EZM wird die Expression der MMPs streng durch Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine und spezifische Inhibitoren, die „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMPs) kontrolliert.

Auf der Transkriptionsebene werden die MMPs vor allem durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone reguliert ⁷⁵. Dabei erhöhen Zytokine, Wachstumsfaktoren, Interleukine und TNF (*tumor necrosis factor*) die Expression auf Genniveau. Interleukin 21 z.B. steigert die Produktion von MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-9 in Fibroblasten ⁷⁶. Glukokortikoide, Östrogen und Progesteron führen überwiegend zu einer Verminderung der Transkription von MMP-Genen. Außerdem haben physikalische Faktoren wie Hitze und UV-Strahlung Einfluss auf die Transkription. Nach ihrer Synthese werden viele MMPs in sezernierten Granulomen gespeichert und können so bei Bedarf schnell freigesetzt werden ⁷⁶.

MMPs sind bei neutralem pH-Wert in der EZM aktiv und werden in inaktiver Form als Proenzyme sezerniert ⁷⁷. Die Inaktivität der Pro-MMPs wird durch eine Blockade des aktiven Zentrums erreicht, die durch eine Interaktion zwischen dem Cystein der Propeptidregion und dem Zinkion entsteht (Cystein-switch) ⁷⁴. Eine Reaktion verschiedener Substanzen, wie z. B. Trypsin, Plasmin und Hypochlorsäure, mit dem an das aktive Zentrum bindende Cystein überführt letzteres in eine nicht bindende Form. Durch Abspaltung einer Aminosäuresequenz, dem sogenannten Propeptid, kommt es dann zur Aktivierung.

MMPs können auch durch andere MMPs aktiviert werden. MT-MMPs wie MMP-14 z.B. können Pro-MMP-2 , Pro-MMP-9 und Pro-MMP-13 aktivieren ⁷⁸. MMP-7 kann u.a. auch Pro-MMP-3 aktivieren ⁷⁹.

Die Hemmung der MMPs wird vor allem durch spezifische Inhibitoren, die TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*), vollzogen. Die TIMPs gehören zur Familie der Kollagenase-Inhibitoren. Bis heute sind vier verschiedene TIMPs bekannt.

TIMP-1, -2 und -4 sind lösliche Proteine, TIMP-3 dagegen ist mit der EZM assoziiert. Alle TIMPs bestehen aus zwei Domänen, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind ⁸⁰. Sie binden im Verhältnis 1:1 an die Zinkregion und die Hämopectindomäne der MMPs. TIMP-1 und TIMP-3 besitzen eine hohe Affinität für MMP-9, TIMP-2 für MMP-2.

Neben ihrer Funktion als MMP-Inhibitor induzieren die TIMPs Veränderungen der Zellmorphologie und sind Wachstumsstimulatoren ⁸¹. Man vermutet, dass sie beim Gewebeumbau im Rahmen der Tumorprogression und der Hemmung der Apoptose von Bedeutung sind ⁸². Bei den unspezifischen Inhibitoren kommt α_2 -Makroglobulin die größte Bedeutung zu ²⁵.

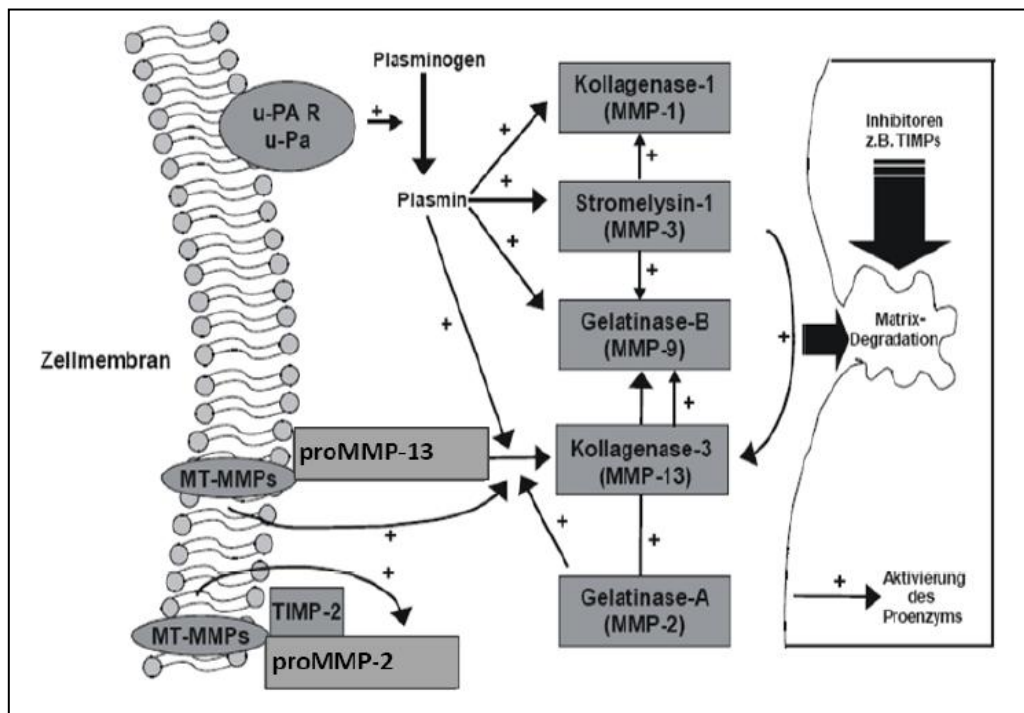


Abbildung 6: Aktivierung und Wirkung von Matrix Metalloproteinasen. Die Aktivierung der MMPs erfolgt durch das Plasminogen/Plasmin-System oder durch das zellgebundene MT1-MMP. Einige MMPs können sich gegenseitig aktivieren. Die Hemmung der MMPs kann durch die spezifisch wirkenden TIMPs erfolgen. Modifiziert nach Murphy ⁸⁵.

Die MMPs und ihre TIMPs können durch die Spaltung von Peptidbindungen u.a. Kollagene und Elastase abbauen und führen dadurch zur enzymatischen Degradation der EZM, der Basalmembran und des intestinalen Stromas. Auf diese Weise haben sie eine wichtige Steuerfunktion beim Gewebeumbau.

Es bestehen substratabhängige Unterschiede bei den einzelnen MMPs, aber zusammen sind sie in der Lage alle Bestandteile der EZM und die Basalmembran abzubauen. Zusätzlich produzieren sie eine Reihe bioaktiver Substanzen wie z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine⁸³.

Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen nehmen die MMPs eine zentrale Rolle in der Wundheilung, der Embryogenese, der Knochenresorption, der Angiogenese, der Apoptose und der Migration von Leukozyten ein.

Eine erhöhte Expression von MMPs konnte bei vielen destruktiven Krankheiten, wie z.B. Arthritis, chronischen Ulzerationen und Zirrhose, nachgewiesen werden⁸⁴. Eine Übersicht über die Funktionen der MMPs ist in Tab. 2 auf S. 24 dargestellt.

2.2.6 MMPs und Malignität

MMPs sind zur Degradation aller wichtigen Bestandteile der EZM und der Basalmembran fähig und nehmen deshalb eine wichtige Rolle bei der Invasion, Angiogenese und Metastasierung maligner Tumoren ein. Die Destruktion der EZM und der Basalmembran ist eine Voraussetzung für das Eindringen maligner Tumorzellen in den Blut- und Lymphkreislauf und damit für die Metastasierung in tumorfremde Organe. MMPs ermöglichen die Migration von normalen und malignen Zellen durch den Körper⁸⁶. Zu der direkten proteolytischen Wirkung der MMPs kommt noch die Wirkung der teilweise von ihnen abgegebenen Substraten wie PAR I aus MMP-1, CCL2 und HB-EGF aus MMP-3 und FasL aus MMP-7. Diese führen zu einer Unterbrechung der Zellverbindungen und beeinflussen die Apoptose⁸⁷.

Eine erhöhte Expression von MMPs konnte bei zahlreichen malignen Tumoren, wie z.B. beim Pankreaskarzinom, dem Mammakarzinom und dem Magenkarzinom nachgewiesen

werden^{88, 89}. Interessant dabei ist die primäre Lokalisation von z.B. MMP-1, -2, -3, -9 und MT1-MMP mRNA beim Mamma-, Lungen- und Prostatakarzinom. Diese MMPs sind dort in den, den Tumor umgebenden Fibroblasten, aber nicht in den Tumorzellen selbst nachweisbar⁹⁰. Weitere Studien haben gezeigt, dass die in den Fibroblasten produzierten MMPs, an die Oberfläche von Tumorzellen binden können und damit die Tumorzellinvasion unterstützen. MMP-2 kann über den TIMP-2/MT-MMP-Komplex an die Tumorzelloberfläche binden, MMP-9 über CD-44 und Typ-IV-Kollagen^{91, 92}. MMP-13 bindet mit Hilfe der Endozytose und der lysosomalen Degradation⁹³.

Die wichtige Rolle der MMPs bei der Tumordinvasion konnte durch Versuche mit Mäusen, denen bestimmte MMPs fehlen (Knockout-Mäusen), verdeutlicht werden. Dabei zeigten Mäuse ohne MMP-7 eine reduzierte Tumorentstehung im Darm⁹⁴. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Mäuse ohne MMP-2 eine verminderte Angiogenese und eine reduzierte Tumorentstehung haben⁹⁵.

Bei vielen Karzinomen korreliert die Inzidenz von Metastasen und die reduzierte Prognose positiv mit dem erhöhten Serumspiegel der MMPs⁹⁶.

Für die Betrachtung der MMPs bei CED ist es von großem Interesse, dass einige dieser MMPs beim KRK vermehrt exprimiert werden. Die Expression von MMP-1, -2, -3, -7, -9, -12, -13 und MT1-MMP bei Vorliegen eines kolorektalen Karzinoms ist in früheren Studien gut untersucht worden (siehe Tab. 4 auf S. 34)^{156, 157}. Beim KRK kann man zwischen malignen Epithelzellen und Stromazellen unterscheiden. Vor allem die Stromazellen besitzen die Eigenschaft, MMPs zu exprimieren⁹⁷. Die Expression der MMPs wird dabei zusätzlich von verschiedenen löslichen Faktoren, wie z. B. EGF (Epidermal growth factor), TGF- α (Tumor growth factor- α), dem TNF- α (Tumornekrose faktor- α) und IL-1 β (Interleukin-1 β) reguliert⁹⁸.

Die beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 können Typ-IV Kollagen, die Hauptkomponente der Basalmembran, spalten und sind deshalb für die frühen

pathophysiologischen Abläufe der Metastasierung wichtig. Es wird vermutet, dass MMP-2 die Aktivierungskaskade innerhalb der MMP-Familie auslöst ⁹⁹.

In einer 2001 veröffentlichten Arbeit von Roeb et al. konnte eine signifikant erhöhte Aktivität von MMP-2 und MMP-9 beim Kolonkarzinom im Vergleich zur normalen Darmschleimhaut nachgewiesen werden. Dagegen war beim Rektumkarzinom keine erhöhte Aktivität gegenüber der normalen Rektummucosa festzustellen ⁴. Andere Studien haben diese Ergebnisse bestätigt und gezeigt, dass eine erhöhte Expression von MMP-9 beim Kolonkarzinom mit einer reduzierten Überlebenslänge korreliert ¹⁰⁰.

MMP-9 wird hauptsächlich von inflammatorischen Zellen innerhalb des Tumors sezerniert und ist für die Migration von Leukozyten und Tumorzellen samt der Angiogenese beim Tumorwachstum wichtig. MMP-9 wird in neutrophilen Granulozyten gespeichert und spielt deshalb auch bei Entzündungsprozessen eine Rolle.

MMP	Methode	Ergebnis	Referenz
MMP-1	IHC ELISA IHC Aktivität	Erhöhung korreliert mit Metastasierung Erhöhung korreliert mit Tumorstaging Erhöhung korreliert mit schlechter Prognose Erhöhung bei KRK korreliert mit der Tumorinvasion	Sunami 2000 Baker 2000 Murray 1996 van Stappen 1990
MMP-7	Zymo IHC RT-PCR IHC Northern RT-PCR	Erhöhung korreliert mit Lebermetastasen Erhöhung korreliert mit Metastasierung Erhöht beim Adenom-Karzinom-Pathway Erhöhung korreliert mit Lebermetastasen Erhöhung korreliert mit DUKES-Stadium 10x erhöht bei KRK	Zeng 2002 Masaki 2001 Heslin 2001 Adachi 1999 Mori 1995 Kumar 1991
MMP-13	IHC	Erhöhung korreliert mit schlechter Prognose	Leeman 2002
MMP-8	Maus	Überexpression von MMP-8 reduziert Metastasierung bei Mammakarzinom im Mausmodell Herunterregulierung von MMP-8 führt zu erhöhter Metastasierung bei Mammakarzinom im Mausmodell	Montel 2004 Montel 2004

Tabelle 4: Studien ausgewählter MMPs beim KRK. ICH = Immunhistochemie, ELISA = Enzyme linked immuno sorbent assay, Zymo = Zomographie. Modifiziert nach Zeng ¹⁰⁰.

2.2.7 MMPs und chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Die genaue Pathogenese der entzündlichen Darmerkrankungen ist bis heute noch nicht bekannt. Bei chronisch entzündlichen Veränderungen der Darmschleimhaut ist das Darmepithel mit Entzündungszellen infiltriert. Die epitheliale Zellproliferation ist verändert und die verschiedenen Bestandteile der EZM werden vermehrt umgesetzt. Dabei spielen die verschiedenen MMPs eine entscheidende Rolle. Die Degradation von Kollagenen und Proteinen in der EZM ist die Voraussetzung für die Migration der Leukozyten und Makrophagen, der Angiogenese und der Wundheilung. Es gibt Hypothesen, nach denen eine Dysregulation der mukosalen T-Zellaktivität zur Entstehung von CED führen kann ¹⁰².

Den MMPs kommt bei der Steuerung der mukosalen T-Zellen eine wichtige Rolle zu. Mehrere Studien konnten eine erhöhte Expression verschiedener MMPs in entzündeter, im Vergleich zur normalen Darmschleimhaut, nachweisen ¹⁰³. Die Höhe der MMP-Expression korrelierte dabei direkt mit Entzündungsaktivität. Von Lampe konnte 2000 zeigen, dass die Expression der mRNA und auf Proteinniveau von MMP-1, MMP-2 und MMP-3 mit dem histologischen Grad der Entzündung korreliert ¹⁰⁴. Dabei war die mittlere Expression von MMP-1 und MMP-3 im Vergleich zur gesunden Schleimhaut 230-fach erhöht.

Eine erhöhte Expression der MMPs kann möglicherweise zu chronischer Entzündung und Ulkusbildung in der Darmschleimhaut führen ¹⁰⁵. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Mäuse ohne MMP-9 (MMP-9 knockout-mice) nach Induktion einer Kolitis mit Dextran-Sodiumsulfat mildere Symptome zeigten, als Mäuse mit MMP-9. Dagegen führte das Fehlen von MMP-2 zu einer deutlich schwereren Kolitis ^{106, 107}.

Eine Reihe von MMPs werden im Rahmen von physiologischen Abwehrmechanismen in der Darmschleimhaut erhöht exprimiert und sind auch in gesundem Darm vorhanden. Beispiele dafür sind MMP-2 und MMP-7. Andere MMPs, wie z. B. die Kollagenasen MMP-1, MMP-8 und MMP-13 sind in der gesunden Darmschleimhaut fast nicht nachweisbar, aber bei CED deutlich hochreguliert. Ihre direkte Rolle für die Entstehung einer CED ist noch nicht geklärt. MMP-1 und MMP-7 konnten in migrierenden

Enterozyten an der Grenze von intestinalen Ulzerationen nachgewiesen werden, was auf einen Beitrag zur Wundheilung schließen lässt ¹⁰⁸.

Daraus ist ersichtlich, dass die Bedeutung der MMPs bei der Pathogenese der CED sehr komplex und vielschichtig ist. Tab. 5 gibt eine Übersicht über publizierte Arbeiten, die die Expression der in unserer Studie gemessenen MMPs bei Vorliegen einer CED untersuchen wollten.

MMP	Expression in der Kolonschleimhaut	Studie	Jahr
MMP-1	Gesund: Niedrig CED: Erhöht	Pedersen et al. Ying et al. Meijer et al. Arikiro et al. v. Lampe et al. Stallmach et. al. Bailay et al.	2009 2007 2007 2006 2001 2000 1994
MMP-8	Gesund: Sehr niedrig CED: Erhöht	Pirila et al.	2003
MMP-13	Gesund: Knochenmark CED: Erhöht	Rath et al. Vaalmo et al	2006 1998
MMP-7	Gesund: Deutlich nachweisbar CED: Erhöht	Pedersen et al. Rath et al. Salmela et al. Matsuno et al.	2009 2006 2004 2003
MMP-19	Gesund: Deutlich nachweisbar CED: Erhöht	Bister et al.	2004
MMP-26	Gesund: Deutlich nachweisbar CED: Unsicher	Bister et al.	2004
MMP-28	Gesund: Deutlich nachweisbar CED: Nicht erhöht	Bister et al.	2004

Tabelle 5: Übersicht über frühere Studien ausgewählter MMPs bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED).

2.2.8 In der Studie untersuchte MMPs

Kollagenasen

Die unter der Gruppe der Kollagenasen zusammengefassten MMPs (-1, -8, -13) sind als einzige bisher bekannte Enzyme in der Lage, die Trippelhelix des fibrillären Kollagens der Typen I bis IV und IX zu degradieren. Die so entstandenen Abbauprodukte können dann von anderen MMPs weiter gespalten werden ¹¹⁴.

2.2.8.1 MMP-1

MMP-1 ist eines der wichtigsten Enzyme für die Degradation der EZM. Es ist in der Lage eine Vielzahl von Kollagenen und Proteinen abzubauen und ist das Hauptenzym für die Spaltung von fibrillärem Kollagen (Typ I, II, III, VII, X). Im Rahmen einer CED oder Pouchitis haben mehrere Studien eine deutliche erhöhte Expression von MMP-1 in der entzündeten Mucosa nachgewiesen ^{137,104}. Die erfolgreiche medikamentöse Behandlung der Pouchitis führte zu einer signifikanten Erniedrigung der Genexpression von MMP-1 ¹⁰⁹.

Mittels Immunhistochemie konnte man zeigen, dass MMP-1 in entzündeter Darmschleimhaut von Myofibroblasten, Makrophagen und CD68-positiven Monozyten exprimiert wird, nicht aber von Epithelzellen ¹⁰⁴. Es wird deshalb vermutet, dass MMP-1 Einfluss auf die Angiogenese, das Remodeling und die Monozytenmigration im aktiven Stadium der Darmentzündung hat. In gesunder Darmschleimhaut ist MMP-1 nicht oder sehr schwer nachweisbar.

Im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe wurde bei Patienten mit CU ein erhöhter Plasmaspiegel von MMP-1 gemessen ¹¹⁰. Eine erhöhte MMP-1-Genexpression konnte unter anderem auch bei aktiver, unbehandelter Zöliakie nachgewiesen werden ¹¹¹.

Beim kolorektalen Karzinom kann MMP-1 sowohl in den Stroma-, als auch in den Tumorzellen nachgewiesen werden. Dabei ist der immunhistochemische Nachweis von MMP-1 in KRK mit Metastasierung und einer schlechteren Prognose assoziiert. Im Gegensatz zum KRK konnte MMP-1 in gutartigen Adenomen nicht nachgewiesen

werden ¹¹². In einer Studie von Baker et al. korrelierte die Expression von MMP-1 mit dem Dukes-Stadium und der Lymphknoteninvasion ¹²⁴.

2.2.8.2 MMP-8

MMP-8 wird physiologisch u.a. von polymorphonukleären Leukozyten im Knochenmark produziert und hat besonders gute katalytische Eigenschaften gegenüber Kollagen Typ I. Im Laufe der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass MMP-8 auch von anderen Zellen, wie z.B. Epithelzellen im Rahmen einer Entzündungsreaktion exprimiert wird. MMP-8 kann dabei unter anderem mit Chemokinen reagieren ¹¹³.

Bei Vorliegen einer CED ist MMP-8 meist deutlich erhöht. Dagegen ist sie in gesunder Darmschleimhaut nur in geringen Mengen oder gar nicht nachweisbar ¹¹⁴. In der entzündeten Darmschleimhaut ist MMP-8 hauptsächlich in den oberflächlichen Epithelzellen nachweisbar.

Beim metastasierten Mammakarzinom konnte interessanter Weise eine deutlich verringerte Expression von MMP-8 im Vergleich zum nicht metastasierten Karzinom festgestellt werden ¹¹⁵. Im Mausmodell hat eine erhöhte Expression von MMP-8 eine protektive Wirkung gegenüber der Entstehung von chemisch induzierten Hautkarzinomen gezeigt ¹¹⁶. Eine Reihe von Studien deutet auf eine antikarzinogene und antimetastatische Rolle von MMP-8 hin. Die Ursprünglich geplante Bestimmung der Proteinexpression von MMP-8 im Rahmen dieser Studie war aufgrund fehlender funktionierender spezifischer Antikörper nicht möglich.

2.2.8.3 MMP-13

Im gesunden Organismus wird MMP-13 in sehr viel geringerer Menge als die anderen beiden Kollagenasen exprimiert. Physiologisch tritt es unter Remodelierungsprozessen im Knochenmark auf. Es hat besonders gute katalytische Eigenschaften gegenüber Typ II Kollagen.

Wie auch MMP-1 und MMP-8 ist MMP-13 bei einer Vielzahl von Entzündungsprozessen nachweisbar. Es ist in der Lage, Kollagene zu degradieren und kann verschiedene Zytokine wie z.B. MCP-3 (*Monocyte chemoattractant protein-3*) und SDF-1 (*Stromal cell-derived factor-1*) inaktivieren ⁷⁰. Aufgrund ihrer Gesamtfunktion geht man davon aus, dass MMP-13 eine bedeutende destruktive Protease ist, deren Expression unter physiologischen Bedingungen exakt reguliert ist ¹¹⁷. Eine signifikant erhöhte Expression von MMP-7 und MMP-13 in entzündlich veränderter Darmschleimhaut bei MC und CU, sowie bei adenomatösen Polypen, konnte 2006 von Rath et al. gezeigt werden ⁶.

In Studien konnte MMP-13 in 91 % der KRK nachgewiesen und immunhistochemisch dem Tumorzellzytoplasma zugeordnet werden. Die Expression von MMP-13 war dabei signifikant höher als in der normalen Kolonschleimhaut ⁵. Eine hohe Expression von MMP-13 korrelierte mit einer schlechten Prognose der Patienten ¹¹⁸.

Pro-MMP-13 kann durch Plasmin, MT1-MMP und MMP-2 aktiviert werden und MMP-13 selbst kann Pro-MMP-9 aktivieren.

2.2.8.4 MMP-7

MMP-7 wird traditionell auch als Matrilysin bezeichnet. Es hat im Vergleich zu den meisten anderen MMPs ein geringes Molekulargewicht und, wie auch MMP-23 und MMP-26, keine Hämopexindomäne.

Funktionell hat MMP-7 ein weites proteolytisches Spektrum und ist in der Lage, Kollagene, Elastin, Proteoglykane, Laminin, Fibronectin und Casein zu degradieren ¹¹⁷. MMP-7 ist zuerst im Uterus von Ratten entdeckt worden. Seitdem ist es in vielen verschiedenen gesunden Geweben nachgewiesen worden. Im Gegensatz zu den meisten anderen MMPs wird es dabei relativ hoch exprimiert und ist vor allem in gesundem Epithelgewebe vorhanden. Dies gilt auch für die gesunde Darmschleimhaut, bei der MMP-7 im Vergleich zu anderen MMPs recht hoch exprimiert wird ¹¹⁹.

Beim Vorliegen einer CED ist die Expression von Matrilysin deutlich erhöht und spiegelt dabei bei der CU die Entzündungsaktivität wieder ^{120, 136}. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Expression von MMP-7 besonders am Rand von Ulzerationen bei Patienten mit einer CED erhöht ist. Es wird deshalb angenommen, dass MMP-7 für die Wundheilung

von Bedeutung ist ¹²¹. In Tierversuchen konnte die Expression von MMP-7 durch den Kontakt mit Bakterien stimuliert werden¹²².

Die genaue Bedeutung von MMP-7 für die Pathogenese einer CED ist bis heute unklar. Es scheint auf jeden Fall für die Wundheilung und die Abwehr von Bakterien im Darmsystem wichtig zu sein.

Die Expression von MMP-7 beim Vorliegen von Dysplasieveränderungen bei einer CU ist von Newell et al. in einer Studie immunhistochemisch untersucht worden. Dabei konnte eine lokalisierte, fokale Expression in Schleimhautabschnitten mit einer LGIN und eine ausgedehntere Expression bei HGIN festgestellt werden ¹²³.

Eine signifikant erhöhte Expression von MMP-7 und MMP-13 in entzündlich veränderter Darmschleimhaut bei MC und CU, sowie bei adenomatösen Polypen, konnte 2006 von Rath et al. gezeigt werden ⁶.

Eine erhöhte Expression von MMP-7 wurde bei 90 % der kolorektalen Adenokarzinome beobachtet ¹²³. MMP-7 scheint außerdem eine wichtige Rolle beim Wachstum von frühen Adenomen und deren Transformation in invasive Karzinome zu haben ¹²⁴. Beim KRK ist MMP-7 hauptsächlich im Bereich der Tumordinvasionsfront nachweisbar und scheint besonders für das Tumorwachstum wichtig zu sein. Eine erhöhte Expression ist mit Fernmetastasierung und kürzerer Überlebenszeit bei KRK assoziiert ¹²⁵. Studien mit MMP-7-knockout-Mäusen haben die Bedeutung von MMP-7 bei der Tumorprogression bestätigt ⁹⁴.

2.2.8.5 MMP-19

MMP-19 ist ursprünglich in der gesunden Brustdrüse und im Leberparenchym gefunden worden. Ihre mRNA konnte danach in vielen Organen, wie z. B. in der Plazenta und Ovarien, der Lunge, dem Pankreas und dem Darmsystem, nachgewiesen werden. Bei der Rheumatoiden Arthritis wurde MMP-19 als Autoantigen in der entzündeten Synovia nachgewiesen ¹²⁶.

In vitro ist MMP-19 u.a. in der Lage Typ-4 Kollagen, Laminin-1, Nidogen, Tenascin-C und Typ-1 Gelatin zu degradieren. Es ist wahrscheinlich nicht in der Lage, andere Pro-

MMPs zu aktivieren¹²⁷. TNF- α kann die Expression von MMP-19 in vitro in Fibroblasten induzieren¹²⁸.

Im Gegensatz zu den meisten MMPs kann MMP-19 in gesundem Brustdrüsengewebe, nicht aber in Tumorzellen beim Mammakarzinom nachgewiesen werden¹²⁹.

Bister et al. konnten 2004 zeigen, dass MMP-19 in gesunder Ileumschleimhaut in den apikalen Villi und in gesunder Kolonschleimhaut in den Krypten exprimiert wird. Bei Entzündung der Darmschleimhaut wird MMP-19 vermehrt exprimiert und konnte dort in Makrophagen und Fibroblasten nachgewiesen werden. An der invasiven Front des Kolonkarzinoms konnte MMP-19 dagegen nicht nachgewiesen werden. In malignen Zellen war in dieser Studie die Expression erniedrigt¹³⁰.

2.2.8.6 MMP-26

Matrylsin 2 (MMP-26) ist die kleinste bis heute bekannte MMP. In vitro kann MMP-26 u.a. Typ-IV Kollagen, Fibronectin, Fibrinogen, Gelatin und α -1 Proteinaseinhibitor degradieren. MMP-26 ist in der Lage pro-MMP-19 zu aktivieren.

Die Expression von MMP-26 konnte bei verschiedenen Tumorerkrankungen wie z.B. bei Lungenkarzinom, Prostatakarzinom und Mammakarzinom nachgewiesen werden¹³¹. TIMP-4 ist der stärkste Inhibitor von MMP-26¹³².

2.2.8.7 MMP-28

Epilysin (MMP-28) ist eines der zuletzt gefundenen MMPs. MMP-28 wird von verschiedenen Tumorzellen exprimiert und wird mit der Zellproliferation bei der epithelialen Wundheilung assoziiert¹³³.

MMP-28 ist wahrscheinlich nicht mit der Invasion maligner Zellen assoziiert. Die Expression von MMP-28 wurde in der gesunden Ileumschleimhaut und im normalen Oberflächenepithel des Kolons nachgewiesen. Im Gegensatz zu den meisten anderen MMPs konnte eine vermehrte Expression von MMP-28 bei CED und ischämischer Kolitis nicht nachgewiesen werden. Beim KRK ist die Expression von MMP-28 vermindert¹³³.

3 AUFGABENSTELLUNG

Bei Vorliegen einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung besteht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von oberflächlichen Dysplasien und den Übergang in bösartige Tumore.

Über die Bedeutung der MMPs für die Entstehung eines Kolitis-assoziierten KRK ist bis heute erst wenig bekannt. In früheren Studien konnte eine erhöhte Expression verschiedener MMPs sowohl beim KRK als auch bei CED gezeigt werden. MMP-7 und MMP-13 sind als Sekretionsprodukte maligner Zellen bekannt. Die Expression von MMP-19 und der relativ neuen MMP-28 sind bisher noch wenig bei Vorliegen einer CED untersucht worden.

Im Rahmen dieser Studie wollten wir die Bedeutung der MMPs bei CED analysieren und sind dabei an einem Kollektiv norwegischer Colitis ulcerosa Patienten folgenden Aufgabenstellungen nachgegangen:

1. Bestimmung der Expression der Kollagenasen MMP-1 und MMP-13, des Matrilysins MMP-7 sowie von MMP-19 und MMP-28 in entzündeter und nicht betroffener Darmschleimhaut. Die Expression sollte sowohl auf Genniveau mittels RT-PCR als auch soweit möglich auf Proteinniveau mittels ELISA bestimmt werden. Liegt eine Erhöhung oder Erniedrigung der Expression im entzündeten Gewebe vor? Steht die Veränderung der Expression in Relation zum Grad der Entzündung?
2. Identifizierung der MMP-produzierenden Zellen mit Hilfe von immun-histochemischen Co-Färbungen. Sind Entzündungszellen an der Produktion der MMPs beteiligt?
Lokalisation der MMPs in der Darmwand. Zeigen die exprimierenden Zellen histopathologische Dysplasien?

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Aufbau der Studie

4.1.1 Rahmenbedingungen

Die Studie entstand in Zusammenarbeit zwischen dem Zentrum für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie, der Justus-Liebig Universität Gießen und der Sektion für Gastroenterologie des Universitätsklinikums Stavanger (Stavanger Universitetssjukehus), Norwegen. Der Doktorand war in der Zeit vom 15. Januar 2006 bis 31. August 2008 als Assistenzarzt im Universitätsklinikum Stavanger tätig.

Das Universitätsklinikum in Stavanger hat ein Einzugsgebiet von ca. 350.000 Einwohnern in der Primär- und 450.000 in der Sekundärversorgung. Es bestehen keine nennenswerte Abwanderungen von Patienten zu anderen Krankenhäusern.

Patienten mit CED werden in der Regel nicht von niedergelassenen Gastroenterologen, sondern von der gastroenterologischen Poliklinik des Universitätsklinikums betreut. Über den Zeitraum von Mai 2007 bis Juli 2008 wurden Patienten des Universitätsklinikums Stavanger in die Studie aufgenommen.

Die Analyse und Auswertung der Proben wurde in Gießen im Labor der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Roeb durchgeführt.

4.1.2 Amtliche Gesuche

Für die Durchführung dieser international aufgebauten Studie mussten umfangreiche Genehmigungen von den norwegischen Behörden eingeholt werden.

Die Studie wurde vom lokalen ethischen Komitee der Universität Bergen akzeptiert und als sehr nützlich bewertet. Die norwegische Gesundheitsbehörde (Helsedirektorat) hat daraufhin die Durchführung der Studie ohne Einschränkung, sowie die Ausfuhr der anonymisierten Gewebeproben und klinischen Daten nach Deutschland genehmigt.

Desweiteren ist die Studie vom Datenschutzbeauftragten der Universität Bergen und vom Beauftragten für Patientensicherheit und Patienteninteressen (Pasientvernombudet) genehmigt worden.

4.2 Materialgewinnung und -aufbewahrung

Das analysierte Untersuchungsmaterial wurde im Rahmen von Routinekoloskopien in der gastroenterologischen Abteilung des Universitätsklinikums Stavanger gewonnen.

Patienten mit einer klinisch und endoskopisch verifizierten CU oder eines MC kamen für eine Aufnahme in die Studie in Frage. Dieses galt sowohl für stationäre als auch für poliklinische Patienten. Eine eventuelle medikamentöse Behandlung einer schon bekannten entzündlichen Darmerkrankung, spielte bei der Aufnahme in die Studie keine Rolle. Vor Aufnahme in die Studie mussten negative Befunde der bakteriologischen Stuhluntersuchungen vorliegen.

- Aufnahmekriterien:*
- Klinisch aktives Erkrankungsstadium
 - Mindestens vier Wochen seit Symptombeginn
 - Histologisch und endoskopisch gesicherte Diagnose einer CU oder eines MC
 - Negative Untersuchung auf darmpathogene Bakterien einschl. Clostridium difficile

- Ausschlußkriterien:*
- Schwangerschaft
 - Blutgerinnungsstörungen, Cumarinbehandlung
 - Infektiöse Darmerkrankungen
 - Thrombozyten $\leq 50.000/\mu\text{l}$

Alle Patienten wurden vor der Untersuchung gründlich vom Doktoranden über die Studie und ihr Widerrufsrecht aufgeklärt und haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben.

Während der Koloskopieuntersuchung wurden jeweils drei Zangenbiopsate aus den Darmabschnitten mit der höchsten und mit der geringsten Entzündungsaktivität entnommen. Direkt nach ihrer Entnahme wurden diese Gewebestücke in Cryo-Tubes in flüssigem Stickstoff (N₂) schockgefroren. Danach wurden sie bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

Alle Proben wurden vom für die Studie verantwortlichen Doktoranden selbst entnommen und gleich behandelt. Die durchschnittliche Ischämiezeit betrug ca. 10 Sekunden.

Die Proben für die histologische Untersuchung wurden so nah wie möglich an den vorher biopsierten Stellen entnommen und von erfahrenen Pathologen der Universitätsklinik Stavanger begutachtet. Die Entzündungsaktivität wurde dabei in die Kategorien normal/nicht vorhanden, leicht, moderat und stark eingeteilt. Die Proben wurden ebenfalls auf das Vorliegen von Dysplasien hin untersucht.

Zusätzlich wurden bei allen Patienten Entzündungsparameter im Blut (CRP, Blutsenkung) und im Stuhl (Calprotektin) bestimmt. Es wurden 2 ml Serum für die spätere Analyse der MMPs entnommen und eingefroren.

Bei allen Patienten wurden weitere klinische Daten wie Krankheitsdauer, Symptomscore, Medikamentenanamnese, Laborwerte und Stuhlproben registriert. Das Protokollschema und der Aufklärungsbogen sind im Anhang ab S. 138 abgebildet.

Alle Daten und Gewebeproben wurden anonymisiert. Der Schlüssel der Kodierung wird vom Doktoranden sicher verwahrt und ist Dritten nicht zugänglich.

Der Probentransport von Norwegen nach Deutschland wurde auf Trockeneis durchgeführt.

4.3 Klinische Daten

4.3.1 Anamnese

Für jeden Patienten wurde ein Protokollschema (siehe S. 138) mit klinischen Daten und einer ausführlichen klinischen Anamnese angefertigt. Registriert wurden das Alter und Geschlecht der Patienten, die Symptombdauer und die Familienanamnese. Es wurden alle zum Untersuchungszeitraum eingenommenen Medikamente registriert.

4.3.2 Endoskopiescore

Im Rahmen der endoskopischen Untersuchung wurde jedem Patienten ein Endoskopiescore zugeordnet. Alle Patienten wurden vom Doktoranden untersucht und entsprechend dem folgenden makroskopischen Score eingeteilt.

Endoscopie-score	Einteilung	Mucosaveränderung
Grad 0	Keine Entzündung	Normale Mucosa
Grad 1	Milde Entzündung	Ödem und reduziertes Gefäßmuster
Grad 2	Moderate Entzündung	Ödem, fehlendes Gefäßmuster, Erosionen
Grad 3	Starke Entzündung	Spontane Blutungen und Ulzerationen

Tabelle 6: Endoskopische Einteilung der Colitis ulcerosa. Modifiziert nach Baron¹⁵⁹.

4.3.3 Histologische Diagnostik

Nach der histologischen Diagnose wurde der Grad der Entzündung in mikroskopisch normale Schleimhaut, leichte, moderate und starke Entzündungsaktivität eingeteilt. Als Kriterium wurden die Infiltrationsdichte von Plasmazellen, Lymphozyten und Granulozyten, sowie die Ausprägung von Ulzerationen und Kryptendestruktion angewendet. Außerdem wurden Angaben über das Vorliegen von akuten Entzündungszeichen vor dem Hintergrund von chronischen Veränderungen gemacht.

4.3.4 Symptomscore

Als Symptomscore wurde bei Vorliegen einer CU eine revidierte Version des Walmsley-Aktivitätsindex benutzt (siehe Tab. 7) ¹³⁴. Dabei wurden die Anzahl der Stuhlgänge am Tag und in der Nacht, Inkontinenz, Blut im Stuhl, der Allgemeinzustand und evtl. extraintestinale Symptome registriert. Es konnten dabei maximal 19 Punkte erreicht werden.

Bei Patienten mit einem MC wurde der *Crohn's disease activity index* (CDAI) als Internetkalkulator verwendet (<http://www.ibdjohn.com/cdai/>).

Symptomscore	
Anzahl der Stuhlgänge am Tag	0: 1 - 3 1: 4 - 6 2: 7 - 9 3: > 9
Anzahl der Stuhlgänge in der Nacht	0: 0 1: 1 - 3 2: 4 - 6
Inkontinenz	0: Keine 1: Leicht (Unkontr. Abgang von Winden) 2: Mittel 3: Schwer
Makroskopisch Blut im Stuhl	0: Kein 1: Spur 2: Ab und zu viel 3: Oft viel
Allgemeinzustand	0: Gut 1: Etwas reduziert 2: Reduziert 3: Schlecht 4: Sehr schlecht
Extraintestinale Symptome	0: Keine 1: Arthritis 1: Pyoderma gangrenosum 1: Erythema nodosum 1: Uveitis
Maximale Punktzahl	19

Tabelle 7: In der Studie verwendete Symptomscore. Abgewandelt nach Walmsley et al. ¹³⁴

4.3.5 Blutwerte

Hämoglobin (g/dl), Leukozyten ($10^9/l$), Thrombozyten ($10^9/l$), CRP (mg/l), SR (mm), s-Eisen ($\mu\text{mol/l}$), Ferritin ($\mu\text{g/l}$), ASAT (GOT, U/l), ALAT (GPT, U/l), ALP (AP, U/l), GGT (U/l), Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$), Albumin (g/l), Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$) und INR wurden aus dem Blut der Patienten bestimmt.

4.3.6 Stuhlproben

Um eine infektiöse Gastroenteritis auszuschließen, wurde bei allen Patienten vor Aufnahme in die Studie eine Stuhlprobe mikrobiologisch auf die darmpathogenen Bakterien Salmonellen, Shigellen, Yersinien, Campylobakter jejuni und E. coli sowie auf Clostridium difficile untersucht.

Alle Patienten haben von zu Hause eine Stuhlprobe eingeschickt, in der das fäkale Calprotektin (FeCal-Test) mittels ELISA bestimmt wurde. Die Analyse wurde vom Labor der Universitätsklinik Ullevål in Oslo durchgeführt.

Ein Stuhl-Calprotektin $< 50 \text{ mg/kg}$ bezeichnet den Referenzbereich. Werte über 300 mg/kg indizieren Entzündungsveränderungen, sind aber nicht spezifisch. Das Calprotektin kann bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, infektiösen Gastroenteritiden, adenomatösen Polypen und gastrointestinalen Karzinomen erhöht sein.

4.4 Isolation der RNA

Die Isolierung der RNA stellte den ersten Arbeitsschritt auf dem Weg zur PCR-Analyse dar und wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit[®] von Qiagen [1] nach Herstellerangaben durchgeführt.

Mit dieser Methode können bis zu 100 µg der RNA, die aus jeweils mehr als 200 Basen besteht, an die Rneasy-Membran gebunden und isoliert werden. Es kommt so zu einer Anreicherung von mRNA, da die meisten anderen RNA-Moleküle, wie zum Beispiel rRNA und tRNA, weniger Nukleotide besitzen und nicht gebunden werden.

Die bei – 80 °C gelagerten Biopsate wurden in 350 µl einer Pufferlösung [2] gegeben und in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube mechanisch homogenisiert [3]. Die Pufferlösung inaktiviert mit Hilfe von Guanidin-Isothiocyanat die in den Biopsien enthaltenen RNasen. Das so entstandene Lysat wurde für drei Minuten bei 14 000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert [4]. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Das zurückbleibende Pellet, bestehend aus Zellresten und Proteinen, wurde verworfen.

Zu dem Lysat wurden 350 µl 70 % Ethanol [5] gegeben und mit Hilfe einer Pipette vorsichtig durchmischt. Dadurch erreichte man die Ausfällung der Nukleinsäuren. Diese Lösung wurde dann auf die im Kit enthaltene RNeasy Spin Column (Qiagen) in eine 2 ml Eppendorf-Tube gegeben und für 15 Sekunden bei 14 000 rpm zentrifugiert. Die in der Probe enthaltene RNA war anschließend an die Membran der Spin Column gebunden.

Das Zentrifugat wurde verworfen und 700 µl Buffer RW1 (Qiagen) wurden auf die RNeasy Spin Column pipettiert und 15 Sekunden bei 14 000 rpm zentrifugiert. Dieses Zentrifugat wurde ebenfalls verworfen und 500 µl Buffer RPE auf die Spin Column pipettiert. Die Probe wurde dann erneut 15 Sekunden bei 14 000 rpm zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und erneut 500 µl Buffer RPE auf die Spin Column pipettiert. Danach wurde für zwei Minuten bei 14 000 rpm zentrifugiert. Nach Abgießen des Zentrifugates erfolgte eine einminütige Trockenzentrifugation.

Die trocken zentrifugierte Spin Column wurde dann auf eine neu beschriftete 1,5 ml Eppendorf-Tube gesteckt. Zur Eluierung der RNA wurden abschließend 30 µl RNase-freies Wasser (Qiagen) auf die Säule gegeben und bei 14 000 rpm eine Minute zentrifugiert. Die so gewonnene RNA wurde sofort auf Eis gelegt und danach bei -80 °C gelagert.

- [1] RNeasy Mini Kit[®] von Qiagen, Katalog nr. 74106
- [2] Pufferlösung: Bestehend aus Buffer RLT (Quiagen) und β-Mercaptoethanol (Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe) im Verhältnis 1 ml RLT und 10 µl β-ME
- [3] Homogenizer: Ultra Turrax T8, Ika-Werke, D-79219 Staufen
- [4] Zentrifuge Mikro 200R von Hettich, 78532 Tuttlingen
- [5] 70% Ethanol, Apotheke Justus-Liebig Universität

4.5 Synthese der komplementären DNA (cDNA)

Die Synthese der cDNA ist eine Voraussetzung für die Durchführung der PCR. Die cDNA ist eine komplementäre DNA und entspricht als Kopie der mRNA der DNA, die die gesuchte mRNA kodiert.

Man gibt kurze Desoxythymidin-Oligonucleotide zu der isolierten RNA, die mit dieser hybridisiert und als Primer für die Reverse Transkriptase wirkt. Die Reverse Transkriptase ist ein aus Retroviren isoliertes Enzym, mit dessen Hilfe mRNAs über RNA-DNA-Doppelstränge zuerst in einzelsträngige DNAs und dann in doppelsträngige DNAs überschrieben werden können. Diese cDNAs erhalten, wie auch Gene, die notwendigen Informationen zur Bildung von Proteinen. Sie besitzen aber im Gegensatz zu ihnen keine Introns (Abb. 7).

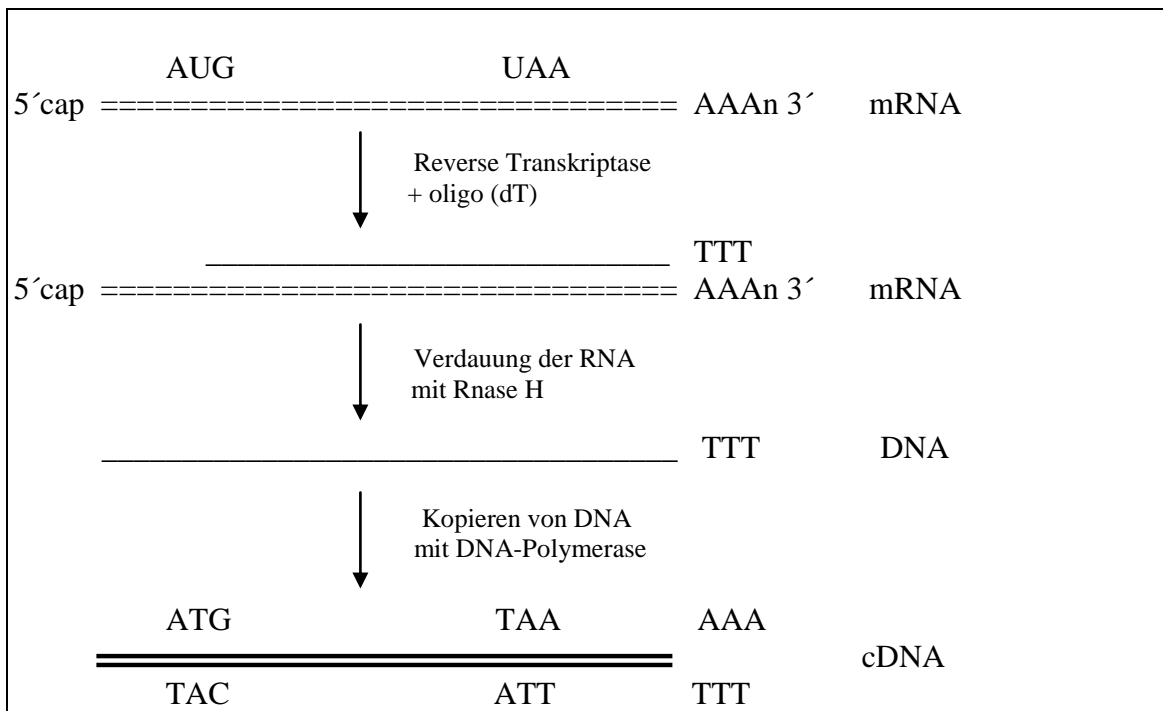


Abbildung 7: Synthese der cDNA. Mit Hilfe der reversen Transkriptase werden mRNAs über RNA-DNA-Doppelstränge zuerst in einzelsträngige DNAs und dann in doppelsträngige DNAs überschrieben.

Aus der zuvor hergestellten mRNA mußte der jeweilige RNA-Gehalt der Proben bestimmt werden. Bei dieser sogenannten RNA-Quantifizierung wurden 2,5 µl der isolierten RNA und 97,5 µl Pufferlösung [1] in eine 1 cm Quarzküvette pipettiert und mit Hilfe der Pipette gut durchmischt. Der RNA-Gehalt und die Reinheit der Probe wurde dann photometrisch [2] bestimmt. Dabei entsprach die Messung bei 260 nm dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren. Die Messung der Verunreinigung bei 280 nm entsprach dem Absorptionsmaximum von Proteinen und DNA.

Die cDNA Synthese wurde mit Hilfe des QuantiTect Kits von QIAGEN [3] durchgeführt. Nach Herstellerangaben wurden aus 1 µg der zuvor isolierten mRNA, einem Wipeout Puffer und RNase-freiem Wasser 14 µl Gesamtansatz hergestellt (siehe unten), der dann bei 42 °C sieben Minuten lang im Thermomixer [4] inkubiert und danach auf Eis zwischengelagert wurde.

Gesamtansatz:

2 µl gDNA Wipeout Buffer, 7-fach	
x µl mRNA	(Sollte jeweils 1 µg RNA enthalten)
<u>y µl dH₂O</u>	(Wurde auf 14 µl aufpipetiert)
14 µl	

Reverse Transkriptase Master Mix:

4 µl 5-fach Quantiscript RT Puffer	
	(enthält Mg ²⁺ und dNTPs)
1 µl Quantiscript Reverse Transkriptase	
	(enthält Rnase-Hemmer)
<u>1 µl</u> Primer Mix (Oligo-dT und Random-Primer)	
6 µl	

In der Zwischenzeit wurde der Reverse Transkriptase Mix hergestellt, der zur Stabilisierung der Transkriptase erforderlich ist. Dieser wurde auf Eis pipettiert und danach zu den 14 µl Gesamtansatz mit der, in ihm enthaltenen mRNA, gegeben. Es entstanden so jeweils 20 µl Lösung.

Diese fertigen Lösungen wurden zuerst 22 Minuten bei 42 °C und danach, zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase, drei Minuten bei 95 °C inkubiert [5]. Anschließend wurden sie sofort auf Eis gelegt und bei -80 °C gelagert.

[1] Pufferlösung: 10 mM Tris-Puffer, pH = 7,5

[2] Photometer Spectronic Genesys 10 Bio von Thermo Electron Corp.

RNA-Gehalt: Absorption bei 260 nm x 40 µg/µl x 40 (Verdünnung) / 1000

Reinheit: Absorption bei 260 nm / Absorption bei 280 nm

[3] QuantiTec kits von QIAGEN, Katalog-Nr. 205311

[4] Thermomixer Comfort von Eppendorf

[5] Thermomixer 5436 von Eppendorf

4.6 RT-PCR

Mit der Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) kann DNA in vitro exponentiell vervielfältigt werden. Damit kann man die Genexpression selbst kleinster Genmengen auf RNA-Ebene genau bestimmen. Die Vervielfältigung wird durch Zugabe des Enzyms "DNA-Polymerase" ermöglicht. Die DNA-Polymerase bindet sich spezifisch an einen DNA-Einzelstrang und synthetisiert mit Hilfe von Primern einen komplementären Strang. In mehreren Zyklen werden diese Doppelstränge durch Erhitzen wieder getrennt und neue Komplementärstränge synthetisiert. Die dabei verwendeten DNA-Polymerasen sind thermostabil.

Für jedes zu messende Gen wurde spezifisch die ideale Temperatur für die Anlagerung der Primer (Annealing) und die Temperatur für die Verlängerung des komplementären DNA-Stranges durch die DNA-Polymerase mit freien Nukleotiden (Elongation) in laborinternen Vorversuchen ermittelt.

Die Vervielfältigung der zuvor hergestellten cDNA kann mit Hilfe des eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green® gemessen werden. Dieser Farbstoff sendet nur nach Bindung an doppelsträngige DNA ein Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 521 nm aus. Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur gebildeten Menge an doppelsträngiger DNA. Die gemessene Fluoreszenz wird in Proportion zur Zeit in ein Koordinatensystem eingetragen. Die Zeitachse wird dabei in die Anzahl der Replikationszyklen eingeteilt. In jedem Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der, in den Templates enthaltenen, DNA-Kopien und es erfolgt bis zur Sättigungsgrenze ein exponentieller Anstieg. Dadurch ergibt sich damit eine sigmoidale Kurve (siehe Abb. 9 auf S. 55).

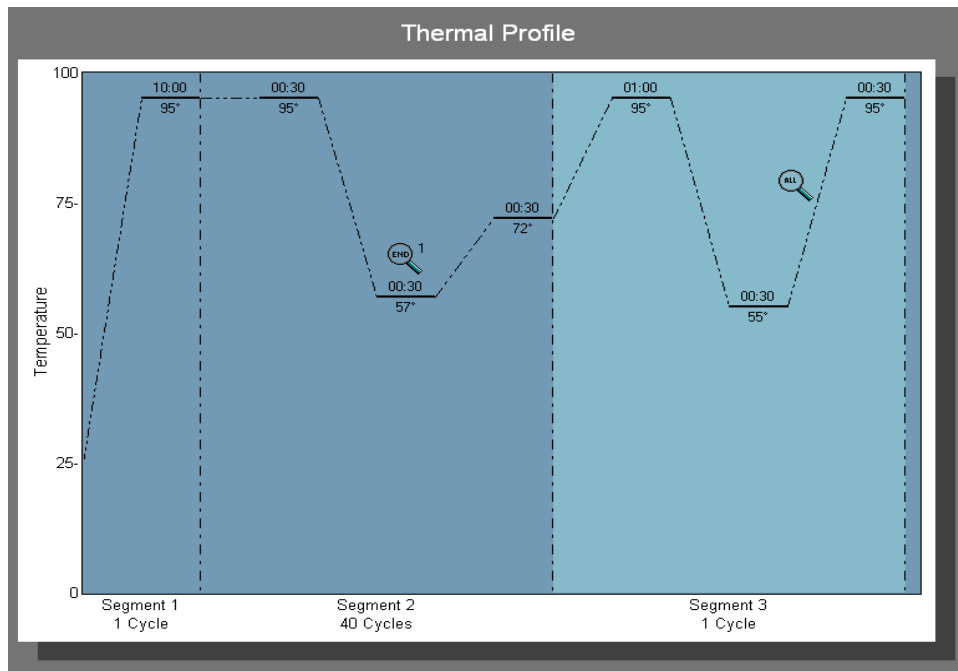


Abbildung 8: Beispiel für ein Temperaturprofil der Replikationszyklen. Die Temperatur und der Zeitraum für Annealing und Elongation sind variabel einstellbar.

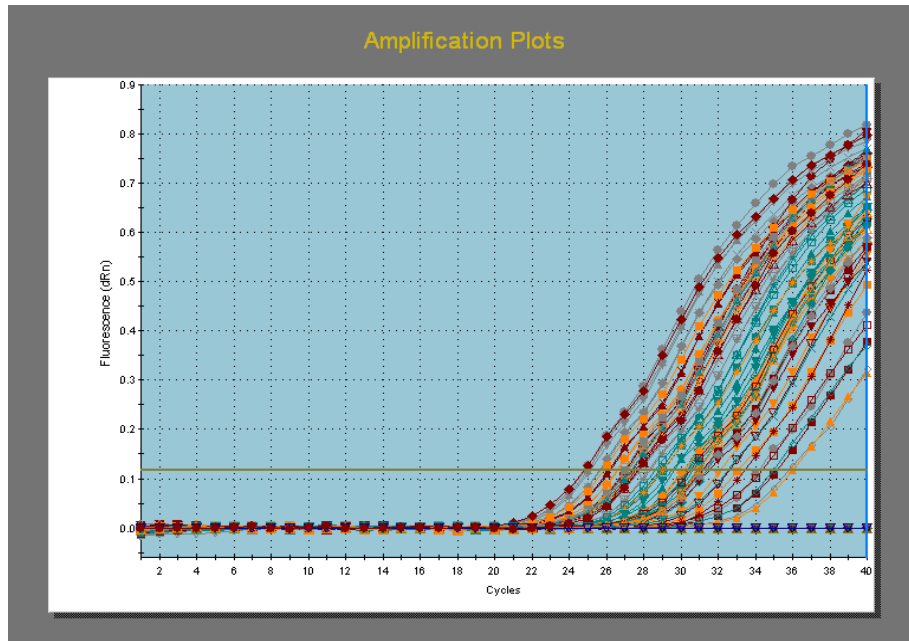


Abbildung 9: Beispiel einer Amplifikationskurve. Sie zeigt die für die jeweiligen Proben gemessene Intensität der Fluoreszenz, abhängig von der Anzahl der durchlaufenen Replikationszyklen. Durch die Sättigung der Reagenzien ergibt sich eine sigmoidale Kurve.

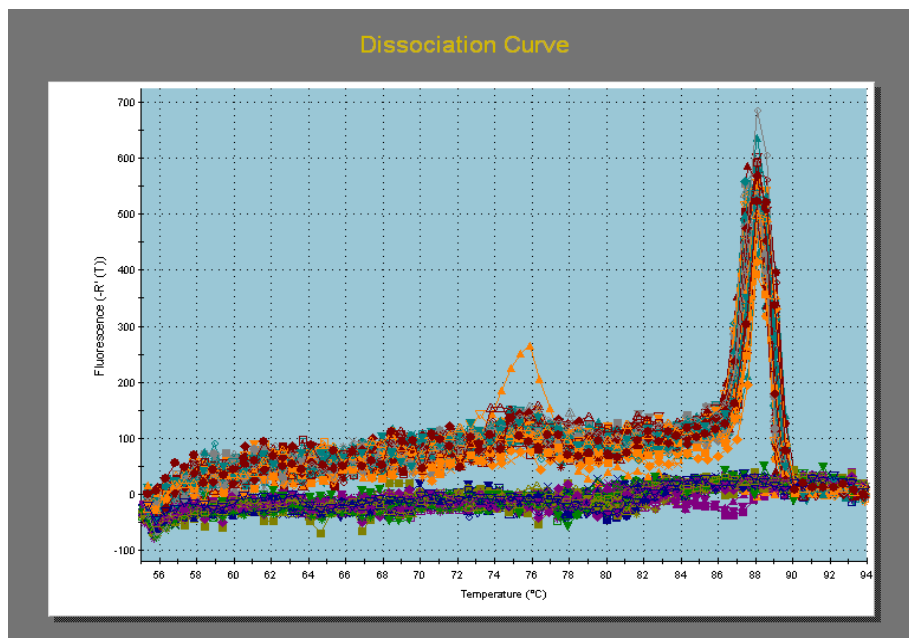


Abbildung 10: Beispiel einer Dissoziationskurve. Auf ihr ist die Fluoreszenzintensität bei den verschiedenen durchlaufenen Temperaturen zu erkennen. Mit ihrer Hilfe können unerwünschte Nebenprodukte entdeckt werden, da diese andere Temperaturoptima besitzen.

Am Ende einer PCR-Analyse wird eine Dissoziationskurve aller Fluoreszenzsignale erstellt. Dadurch kann überprüft werden, ob andere unerwünschte Nebenprodukte das Endergebnis verfälschen. Diese Nebenprodukte haben andere Schmelzpunkte, als die zu untersuchende DNA. Es entstehen dadurch zusätzliche Peaks in der Dissoziationskurve.

Der Punkt mit der grössten Steigung in der Amplifikationskurve (siehe Abb. 9) wird als Threshold-Wert (C_T Wert) bezeichnet. Er bezeichnet den Zyklus, bei dem sich das Fluoreszenzsignal am deutlichsten von der Hintergrundfluoreszenz unterscheidet. Dabei ist der Threshold umso größer, je kleiner die anfangs vorhandene cDNA-Menge war.

Die PCR-Effizienz ist ein Qualitätsindikator für die durchgeführte PCR-Messung. Sie errechnet sich aus der Steigung der linearen Regression über die Auftragung der Threshold-Werte gegen den dekadischen Logarithmus der Kopienanzahl. Liegt die Effizienz zwischen 1,8 und 2 ist die PCR-Messung von guter Qualität.

Um kleine Pipettierfehler auszugleichen, wurden alle Analysen doppelt durchgeführt und nachher der Mittelwert der Ergebnisse gebildet.

In jeder Analysereihe wurden Negativkontrollen ohne cDNA durchgeführt, um so eine evtl. Verunreinigung des Reaktionsansatzes aufzudecken.

Um eine Aussage über die tatsächliche Höhe einer Genexpression zu bekommen, musste die Expression eines Referenzgens bestimmt werden, das konstant im Gewebe exprimiert wird und nicht pathologischen Regulationsmechanismen unterworfen ist. Solche Gene werden als Housekeeping-Gene bezeichnet. Nach laborinternen Vorversuchen wurde 18sRNA als ideales Housekeeping-Gen ausgewählt. Das alternativ getestete GAPDH (*Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase*) zeigte eine schwächere Primereffizienz. Aus der Differenz der Threshold-Werte zwischen dem zu messenden Gen und des Housekeeping-Gens ergibt sich eine Quantifizierung der Genexpression.

Die im Rahmen der Studie benutzten Primer wurden mit Hilfe des Primersuchprogramms Frodo Primer 3, Version 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu>) designet.

Die quantitative PCR wurde mit dem Multiplex Quantitative PCR-System MX 3000P von Stratagene durchgeführt. Für jedes Primerpaar ist in laborinternen Vorversuchen die optimale Anlagerungstemperatur (Annealingtemperatur) bestimmt worden.

Zur Analyse wurde 1 µl cDNA in jeweils 24 µl Reaktionsansatz gegeben. Die Zusammensetzung der MMP-spezifischen Reaktionsansätze ist in Tab. 8 aufgeführt.

	18sRNA	MMP-1	MMP-7	MMP-13	MMP-19	MMP-28
	(µl)	(µl)	(µl)	(µl)	(µl)	(µl)
MgCl ₂	1	1	0	0	1	1
L-Primer (sense)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,2	0,2
R-Primer (antisense)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
SxbrGr/Rox	12,6	12,6	12,6	12,6	12,6	12,6
cDNA	1	1	1	1	1	1
Aqua dest	9,4	9,4	10,4	10,4	9,7	9,7

Tabelle 8: Reaktionsansätze RT-PCR

	Nukleotidsequenz 5'→3'	GenBank Acc. Nr.
18s RNA		NR_003286
Sense	gatcagataccgtcgtagtcc	
Antisense	tatcaatctgtcaatcctgtcc	
MMP-1 human		NM_002421
Sense	aagttgaaaagcggagaaatag	
Antisense	tttcaatcctgtaggctcagatg	
MMP-7 human		NM_002423
Sense	agtttagaagccaaactcaagg	
Antisense	tgcggttaagtctcgagtatatg	
MMP-13 human		NM_002427
Sense	gcagtctttcttcggcttag	
Antisense	ggagttacatcgaccaaac	
MMP-19 human		NM_002429
Sense	ctttcaagggggactatgtg	
Antisense	tattcagcttctggggaag	
MMP-28 human		NM_024302
Sense	gaggcattcctagagaagtacg	
Antisense	ctagcaacaagtcactgatcc	

Tabelle 9: Übersicht der bei der RT-PCR verwendeten Primersequenzen.

Gen	Annealing °C	Elongation °C	Zyklen	L-Primer µl	MgCl
18sRNA	57	72	40	0,5	+
MMP-1	57	72	40	0,5	+
MMP-7	60	72	40	0,5	+
MMP-13	57	72	45	0,5	–
MMP-19	57	72	40	0,1	+
MMP-28	60	72	40	0,2	+

Tabelle 10: Bei der RT-PCR verwendete Einstellung der Annealing- und Elongationstemperatur.

Ausrüstung:

Multiplex quantitative PCR-System MX 3000P von Stratagene, Katalog Nr. 401 401

Primer (Sense und Antisense) von Eurofins MWG Operon, Ebersberg

Reagiergefäße 1,5 und 0,5 ml von Sarstedt

Platinum SYBR Green q PCR SuperMix von Invitrogen, Kat. Nr. 11733-038

4.7 ELISA

4.7.1 Isolierung der Mikrosomen

Die quantitative Proteinbestimmung der MMPs wurde mittels ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) durchgeführt. Da MMPs extrazelluläre Proteine darstellen, erfolgte im ersten Arbeitsschritt die Isolierung der Mikrosomenfraktion.

Direkt vor Gebrauch wurde eine Tablette Mini Complete [1], in der Proteaseinhibitoren enthalten sind, in 3,5 ml aqua dest. gelöst. Diese Lösung wurde im Verhältnis 1:1 mit dem Homogenisierungspuffer (siehe unten) unter Zugabe von 0,7 µl Pepstatin A [2] und 7 µl PMSF [3] gelöst. In 1 ml dieser Lösung wurden dann jeweils eine Biopsie der pathologischen und eine der Referenzproben mit Hilfe des Ultra Turrax homogenisiert und eine Stunde bei 4 °C und 31 000 Umdrehungen ultrazentrifugiert [4]. Das so gewonnene Pellet wurde in 80 µl Microsomal storage buffer (MSB) (siehe unten) resuspendiert und danach bei -80 °C zwischengelagert.

1 molare HEPES Lösung: N-[2 Hydroxyethyl] piperazine-N1-[2 ethansulfonic acid]
von Sigma-Aldrich GmbH, Germany
HCl zur pH-Einstellung (pH 7,5), Roth
Aqua dest.

Homogenisierungspuffer: 1,72 g Saccharose (Carl Roth GmbH)
+ 200 µl 1 M HEPES-Lösung, pH 7,5
+ 40 µl 0,5 M EDTA, pH 8
+ mit aqua dest. auf 10 ml Gesamtvolumen auffüllen

Microsomal storage buffer: 2,06 g Saccharose
+ 1 M HEPES-Lösung, pH 7,5
+ mit aqua dest. auf 10 ml Gesamtvolumen auffüllen

- [1] Mini Complete von Roche
- [2] Pepstatin A von Sigma-Aldrich GmbH
- [3] PMSF von Sigma-Aldrich GmbH
- [4] Ultrazentrifuge L7 von Beckman, USA

4.7.2 Proteinmessung nach Bradford

Die Proteinkonzentration der einzelnen Proben wurde mittels der Proteinbestimmung nach Bradford bestimmt. Als Standard wurde Bovines Serum Albumin (BSA) [1] in einer Konzentration von 1 µg/µl verwendet. Es wurden daraus Verdünnungen in aqua dest. mit 2, 4, 6, 8 und 10 µg Proteingehalt und 800 µl Gesamtvolumen in Ratiolab® Küvetten [2] hergestellt. Diese wurden im Spektralphotometer bei 595 nm gegen destilliertes Wasser (aqua dest.) gemessen und daraus die Eichkurve erstellt.

Im Probenansatz wurden 2 µl der zuvor hergestellten und in MSB gelösten Probe zu 798 µl aqua dest gegeben. Die zu messende Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 200 µl Bio-Rad Reagens [3] gestartet, hochtourig geschüttelt und dann fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die einzelnen Proben hatten jetzt 1 ml Gesamtvolumen. Daraus wurden jeweils zweimal 450 µl in die Küvetten pipettiert und somit zwei Messungen je Probe durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 595 nm im Spektralphotometer [4] gegen den Probenleerwert (aqua dest.).

Probenansatz:

Lösung	Probenmenge	Aqua dest.	Bio-Rad Substanz
BSA 2 µg	2 µl	798 µl	200 µl
BSA 4 µg	4 µl	796 µl	200 µl
BSA 6 µg	6 µl	794 µl	200 µl
BSA 8 µg	8 µl	792 µl	200 µl
BSA 10 µg	10 µl	790 µl	200 µl
Probenleerwert	0	800 µl	200 µl
Probenansatz	2 µl	798 µl	200 µl

- [1] Bovine Serum Albumin von PAA Laboratories GmbH, Pasching
- [2] Ratiolab[®] Küvetten, Halbmikro, PS. Ratiolab GmbH, Dreieich
- [3] Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- [4] Spektralphotometer Spectronic Genesys 10 Bio von Thermo Electron Corporation

4.7.3 Durchführung der ELISA

Die quantitative Bestimmung der Konzentration der MMPs wurde mit Hilfe des Immunassays von Quantikine[®] [1] durchgeführt. Der Assay wurde zuerst auf Raumtemperatur gebracht. Danach wurde die Analyse nach Herstellerangabe durchgeführt.

Der Waschpuffer (WP) wurde aus 20 ml Waschpufferkonzentrat [2] und 480 ml aqua dest. in einem 1 Liter Messzylinder [3] hergestellt. Danach wurden die Standardlösung [4] für die jeweilige MMP-Analyse in 1 ml (MMP-7) bzw. 0,5 ml (MMP-1) aqua dest. gelöst und 30 Minuten auf den Durchschüttler gestellt.

Die zu analysierenden Proben wurden auf Eis gestellt. In einem Vorversuch wurde die zur Analyse notwendige Proteinkonzentration ermittelt. Wir fanden dabei heraus, dass wir 20 µg Gesamtprotein einsetzen müssen, um mit den Ergebnissen ungefähr im mittleren Messbereich der MMP-Assays zu liegen.

Herstellen der Standards:

Wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben, wurden die verschiedenen Standards durch Verdünnen hergestellt. Bei der Analyse von MMP-7 wurden 360 µl des Calibrator Diluents [5] zusammen mit 40 µl Standardkonzentration in die 1,5 ml Eppendorf-Küvette für den 10 ng/ml-Standard pipettiert. In die Küvetten der anderen Standards wurden 200 µl Calibrator Diluent pipettiert. Wie graphisch in Abb. 11 auf S. 62 dargestellt, wurden die notwendigen Standardkonzentrationen durch Umpipettieren hergestellt.

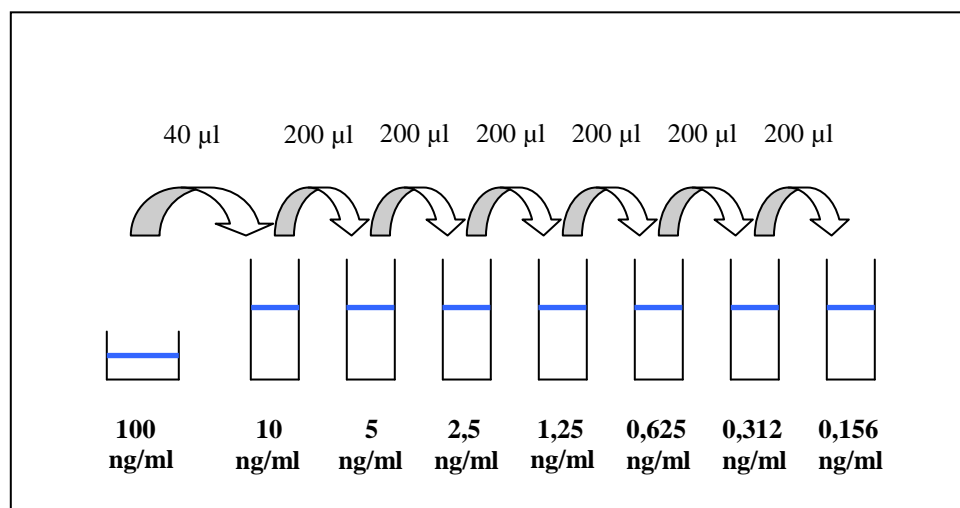


Abbildung 11: Schema zur Herstellung der Verdünnungsreihe des Calibrator Diluents RD6-28

Für die, zu analysierenden Proben, wurden 1,5 ml Küvetten beschriftet. Für die Analyse von MMP-7 wurden dann jeweils ein Volumen entsprechend 20 µg Proteininhalt auf 110 ml Gesamtvolumen in das Calibrator Diluent pipettiert und auf durchmischt.

Jetzt wurden jeweils 50 µl der Standardlösungen und der zu analysierenden Proben auf die 96-Well-Platten pipettiert. Jede Probe wurde doppelt aufgetragen.

Die so bestückte Well-Platte, wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf den Durchschüttler [6] bei 500 rpm gegeben.

Danach wurden der Inhalt der Wells abgeschüttet, kräftig abgeklopft und vier mal mit der Waschlösung gewaschen. In die gewaschenen Wells wurden jeweils 200 µl MMP-7 Konjugatlösung [7] pipettiert und erneut zwei Stunden auf dem Durchschüttler inkubiert.

Im nächsten Arbeitsschritt wurde der oben beschriebene Waschvorgang wiederholt. Es wurden 200 µl Substrat-Solution auf die Wells pipettiert und mit Pipettenspitzen durchmischt. Die Substrate-Solution wurde unmittelbar vor dem Gebrauch durch das Mischen von Color Reagent A und B [8] hergestellt. Die 96-Well-Platte musste ab jetzt vor Licht geschützt werden und wurde für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Farbreaktion zu beenden, wurden zum Abschluss 50 µl der Stop-Solution [9] auf die Proben pipettiert.

Die anschließende Analyse wurde mit dem 96-Well-Platten Analysegerät Fusion[®] [10] durchgeführt.

- [1] Quantikine[®] Human MMP-7 (total) Immunoassay von R&D Systems,
Katalog Nr. DMP700
- Quantikine[®] Human MMP-13 (total) Immunoassay von R&D Systems,
Katalog Nr. DM1300
- Quantikine[®] Human MMP-1 (total) Immunoassay von R&D Systems,
Katalog Nr. DMP100
- [2] Wash Buffer Concentrate von R&D Systems, im Set enthalten
- [3] Messzylinder von Firma Hirschmann
- [4] Total MMP-1, -7 og -13 Standard, Konz. 100 ng/ml von R&D Systems, im Set
enthalten
- [5] Calibrator Diluent RD6-28 von R&D Systems, im Set enthalten
- [6] Durchschüttler von Vibrax VXR basic von IKA
- [7] Total MMP-7 Conjugate von R&D Systems, im Set enthalten
- [8] Color Reagent A von R&D Systems, im Set enthalten
 Color Reagent B von R&D Systems, im Set enthalten
- [9] Stop Solution von R&D Systems, im Set enthalten
- [10] Fusion[®] von Packard Bio Science Comp.

4.8 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Untersuchung wurden Proben ausgewählt, die eine besonders differenzierte Regulation der MMPs in gesundem und krankem Gewebe gezeigt haben.

Die in Tissue-tek [1] gefrorenen Proben wurden am Kryotom [2] in 3 µm dicke Schnitte geschnitten und auf einen Objektträger [3] gegeben. Danach wurden sie bei -20 °C gelagert.

Als Kontrolle wurden gereinigte unspezifische Isotyp-IgG der gleichen wie für die Färbungen verwendeten Spezies verwendet.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden für MMP-13 und MMP-28 durchgeführt. Die Co-Färbungen haben wir mit CD3 (markiert T-Lymphozyten), und vWF (markiert Endothelzellen) und DAPI-Kernfärbung entsprechend der folgenden Arbeitsschritte durchgeführt:

1. Die Gefrierschnitte wurden zwei Minuten in einer -20 °C kalten Lösung aus Aceton und Methanol, die im Verhältnis 1:1 hergestellt wurde, fixiert.
2. Die fixierten Kryoschnitte wurden dreimal fünf Minuten in PBS (1x) plus 0,05 % Tween gewaschen. Dazu wurden die Objektträger in eine Küvette gegeben und die Waschlösung nach jeweils fünf Minuten ersetzt. Während des Waschvorganges standen die Objektträger auf dem Schüttler.
3. Auf die Objektträger wurden jeweils 60 µl Blockier Mix pipettiert und danach eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur gelagert.
4. Die Objektträger wurden nach dem Blockiervorgang vorsichtig auf Papiertüchern abgeschüttelt und um die Schnitte herum abgetupft. Jetzt wurden die Mausantikörper gegen die jeweils zu untersuchenden MMPs aufpipettiert. Diese wurden im Verhältnis 1:50 in PBS plus 1% PBA gelöst und lagen so in einer Konzentration von 2 µg/ml vor. Für die Kontrollprobe wurde Ratten-Serum mit einer Verdünnung von 1:1000 in PBS (1x) benutzt. 60 µl der jeweiligen Lösung

- wurden auf die Objektträger pipettiert und danach eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert.
5. Dreimal zweiminütiges Waschen der Objektträger in der Waschlösung. Danach wurde um die Proben herum vorsichtig abgetrocknet und die Ziegen-Anti-Maus Antikörper Alexa 488 zur Färbung der Maus-Antikörper aufgetragen. Diese wurden im Verhältnis 1:1000 in PBS (1x) gelöst und auf die Objektträger pipettiert. Danach folgte eine 20 minütige Inkubation in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur.
 6. Nachdem die Objektträger dreimal zwei Minuten in der Waschlösung gewaschen und um den Schnitt herum getrocknet wurden, konnte der Antikörper CD3 (bzw. vWF) für die zweite Färbung gegen Lymphozyten (bzw. Endothelien) im Verhältnis 1:50 in 1 % PBS verdünnt, aufgetragen werden. Die Objektträger wurden dann eine Stunde in der feuchten Kammer inkubiert.
 7. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Objektträger vorsichtig abgeklopft und dreimal zwei Minuten in der Waschlösung gereinigt. Danach wurde mit dem Ziegen-anti-Kaninchen Antikörper Alexa 568 der zweite Antikörper zu Färbung der Antikörper CD3 bzw. vWF aufgetragen. Dieser wurde ebenfalls in einer Verdünnung 1:1000 in PBS benutzt. Es erfolgten erneut eine 20 minütige Inkubation bei RT in der feuchten Kammer.
 8. Die Objektträger wurden dreimal zwei Minuten in die Waschlösung gegeben und danach vorsichtig mit Papiertüchern um den Schnitt herum getrocknet. Jetzt erfolgte die Färbung der Zellkerne mittels DAPI. Dazu wurden jeweils 50 µl DAPI-Lösung auf die Kryoschnitte gegeben und drei Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger wieder dreimal zwei Minuten gewaschen.
 9. Die Objektträger wurden nun gründlich und vorsichtig um die fertig gefärbten Kryoschnitte herum abgetrocknet. Es wurde zügig jeweils ein Tropfen Dako Fluoreszenz-Medium aufgetropft und das Objektglas aufgelegt. Die jetzt fertigen Präparate wurden im Dunkeln getrocknet.

Verwendete Lösungen:

PBS (10x): 80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na₂HPO₄ (di-Natriumhydrogenphosphat) x 2 H₂O und 2,45 g KH₂PO₄ wurden in 950 ml aqua dest. gelöst und dann das Gesamtvolumen auf 1000 ml mit aqua dest aufgefüllt. Um das Bakterienwachstum in der Lösung zu hemmen, wurde noch eine Spatelspitze Thimersosal hinzugegeben.

PBS (1x): 100 ml PBS (10x) wurden in 900 ml aqua dest. gelöst und auf dem Durchschüttler gut durchmischt. Der pH der Lösung wurde kontrolliert und mit Hilfe von HCL auf 7,4 eingestellt.

Waschlösung: PBS (1x) mit 0,05 % Tween

Blockier Mix: Bestehend aus 5 % BSA, 0,1 % Coldfish Gelatine, 0,1 % Triton X-100 und 0,05 % Tween gelöst in PBS (1x) mit pH 7,4.

Benutzte Ausrüstung:

- [1] Tissue-tek von Sakura-Firetek
- [2] Kryotom CM 1850 UV von Leica
- [3] Objektträger Super Frost Ultraplus[®] von R. Langenbrinck

Durchschüttler von Vibrax VXR basic von IKA

NaCl von Firma Roth

KCl von Firma Roth

HCL von Firma Roth

Na₂HPO₄ x 2 H₂O von Firma Roth

KH₂PO₄ von Firma Merck, Darmstadt

Thimersosal von Sigma

Aceton von Firma Merck, Darmstadt

Methanol von Fluka

Tween von Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

5 % BSA von PAA Laboratories GmbH, Cölbe

0,1 % Coldfish Gelatine von Sigma

0,1 % Triton X-100 von Sigma

DAPI von Sigma-Aldrich, Katalog Nr. D9564-10MG

Dako Fluorescent Mounting Medium von Dako, Katalog Nr. S3023

Laborwage von Faust, Germany

pH-Meter von Metrohn, Schweiz

Vortex Mixer von Neolab

Mikroskop Leitz DMRB von Leica

Photoapparat Nikon coolpix 5400

Antikörper	Hersteller	Katalog nr.
Mouse anti MMP-13 human IgG (latentes und aktives MMP-13), 100 µg	Calbiochem	IM44L-100UG
Goat anti mouse IgG Alexa 488	Molecular Probes, Invitrogen	A11017
Goat anti rabbit IgG Alexa 568	Molecular Probes, Invitrogen	A21069
Goat anti rat IgG Alexa 568	Molecular Probes, Invitrogen	A11077
AffiniPureF(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), 1,3 mg/ml	Dianova	111-006-003
AffiniPure Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L), 1,3 mg/ml	Dianova	115-007-003
Isotyp Rat IgG	Jackson Immuno Res. Lab	012-000-003
Isotyp Goat IgG	Jackson Immuno Res. Lab	005-000-003
Isotyp Rabbit IgG	Jackson Immuno Res. Lab	011-000-003
Isotyp Mouse IgG	Jackson Immuno Res. Lab	015-000-003
Rabbit anti vWF	Abcam	ab6994-100
Rabbit anti CD3	Abcam	ab16044

Tabelle 11: Übersicht über die bei den Färbungen verwendete Antikörper.

4.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und deren graphische Darstellung wurde mit dem Programm SPSS Version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt.

Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests und des Shapiro-Wilk-Tests wurden die Daten auf das Vorliegen einer Normalverteilung hin untersucht.

Die Berechnung der Signifikanzen für die Genexpression der untersuchten MMPs in den Referenzproben und den jeweils zugehörigen patientinternen Krankproben erfolgte mit dem zweiseitigen Wilcoxon Rangsummen-Test für verbundene Stichproben.

Die Signifikanzen zwischen den Subgruppen in den Krankproben wurden mittels Mann-Whitney-Test berechnet. Dieser Test war hierzu am Besten geeignet, da die Werte in den Subgruppen nicht sicher normalverteilt waren und teilweise nur sehr kleine Stichproben vorlagen.

Ein signifikanter Unterschied der Gruppen wurde als $p < 0,05$ definiert. Als hochsignifikant galten p -Werte $< 0,01$. In der graphischen Darstellung wurden $p < 0,05$ mit *, $p < 0,01$ mit ** und $p < 0,001$ mit *** dargestellt.

Die relative Genexpression der MMPs wurde als $\Delta\Delta C_t$, normiert auf das Housekeeping-Gen und die patientinterne Referenzprobe, angegeben¹³⁵.

Die graphische Darstellung der statistischen Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von Box-and-Whisker-Plots. Dabei stellt der obere Balken des Boxplots die 75 %-Perzentile und der untere Balken die 25 %-Perzentile dar. Die fett hervorgehobene Linie im Inneren des Boxplots bezeichnet den Median. Das jeweilige Maximum und Minimum der Ergebnisse wird durch die Endpunkte der vertikalen Linien ober- und unterhalb des Boxplots dargestellt. Werte, die außerhalb dieses Bereiches lagen, wurden als Ausreißer bezeichnet und durch einen Punkt (•) dargestellt.

Werte, die mehr als drei Boxlängen außerhalb eines Boxplots liegen, wurden als Extrem-

werte definiert und graphisch als Stern (*) dargestellt. In einigen Grafiken wurden diese Extremwerte nicht dargestellt, da sie zu einer erheblichen Veränderung der Skalierung und damit zu einer schlechteren Darstellung geführt hätten.

5 ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG

5.1 Klinische Daten

Im Zeitraum von Juni 2007 bis Juli 2008 wurden insgesamt 39 norwegische Patienten aus dem Raum Stavanger, Norwegen, mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung in die Studie aufgenommen. Die Patienten wurden alle in der Gastroenterologischen Abteilung der Universitätsklinik Stavanger untersucht und behandelt. Alle Patienten wurden vom Doktoranden selbst endoskopiert und alle entnommenen Gewebeproben gleich behandelt.

Im, für die Aufnahme in die Studie gegebenen Zeitraum, konnten nur vier Patienten mit Morbus Crohn in die Studie aufgenommen werden. Viele Patienten mit MC lagen unterhalb der vorgeschriebenen Altersgrenze von 18 Jahren.

Aufgrund der geringen Fallzahl von $n = 4$ Patienten mit MC wurde auf eine Analyse der MMPs in dieser Gruppe verzichtet. Sie wurden aus der statistischen Auswertung herausgenommen.

Tab. 12 auf S. 71 gibt eine demographische Übersicht über alle in die Studie aufgenommen Patienten. Im Verlauf der 13 Monate dauernden Inklusionsphase konnten 35 Patienten mit CU, die die Aufnahmekriterien erfüllten, in die Studie aufgenommen werden. Es lagen mit $n = 19$ etwas mehr weibliche Patienten gegenüber $n = 16$ männliche Patienten vor. Kein Patient wurde nachträglich wieder aus der Studie herausgenommen.

Das Alter der Studienpopulation lag im Median bei 37,00 Jahren, wobei eine relativ große Streuung zwischen 21 und 74 Jahren vorlag. Im Shapiro-Wilk-Test wurde das Vorliegen einer Normalverteilung mit einer Signifikanz von $p = 0,024$ zurückgewiesen.

Um den Grad der Erkrankung und die Symptome der Patienten vergleichbar machen zu können, wurde der vereinfachte Symptomscore nach Welmsley verwendet. Bei einer

vorgegebenen Skala von 1 bis 19 lag der Median bei 6,75. Diese Werte waren normalverteilt.

	Colitis ulcerosa n = 35	Morbus Crohn n = 4
Geschlecht	m = 16 w = 19	m = 2 w = 2
Alter (Jahre) Mittelwert Median	38,51 37,00 (21 – 74)	26,00 26,00 (18 – 34)
Symptomscore Median	7,00 (1 – 19) (Welmsley)	
Krankheits- ausdehnung	Proktitis n = 2 Proktosigmoiditis n = 14 Linksseitige Kolitis n = 5 Totalkolitis n = 14	Terminale Ileum n = 1 Terminale Ileum und Kolon n = 2 Nur Kolon n = 1
Anzahl entnommener Gewebeproben	Krankproben n = 105 Referenzproben n = 105	Krankproben n = 12 Referenzproben n = 12

Tabelle 12: Demographische und klinische Daten, der in die Studie aufgenommenen 39 Patienten.

Ziel der Studie war es, die Genexpression der zu untersuchenden MMPs in den Krankproben mit den patientinternen Referenzproben zu vergleichen. Die Ausdehnung der Erkrankung im Darm wurde nach dem endoskopischen Befund in vier Subgruppen unterteilt.

Im Darmsegment mit den endoskopisch am stärksten ausgeprägten Entzündungsveränderungen wurden jeweils drei Gewebeproben entnommen und als „Krankprobe“ bezeichnet. Eine endoskopisch verifizierte Entzündung des Rektums (Proktitis) lag bei zwei Patienten vor. Bei 14 Patienten waren Entzündungsveränderungen im Rektum und Sigmoideum (Proktosigmoiditis), und bei 5 Patienten zusätzlich im Kolon descendens (linksseitige Kolitis) nachweisbar.

In dem Darmsegment mit endoskopisch normaler, oder ggf. am schwächsten ausgeprägter Entzündung, wurden drei weitere Gewebeproben entnommen und als „Referenzprobe“ bezeichnet. Bei 18 der 21 Patienten mit begrenzter Kolitis zeigte die histologische Auswertung der Referenzprobe keine nachweisbaren Entzündungsveränderungen.

In 14 Fällen lagen im gesamten Dickdarm entzündliche Veränderungen vor (Totalkolitis) und die Referenzprobe zeigte deshalb keinen histologisch normalen Befund. Bei diesen Patienten wurden die Referenzproben im Segment mit der makroskopisch am leichtesten entzündeten Schleimhaut entnommen. Abb. 12 zeigt eine Übersicht über die Krankheitsausdehnung der in dieser Studie untersuchten Patienten mit CU.

Insgesamt wurden 105 Krankproben und 105 Referenzproben entnommen und durch zwei erfahrene Pathologen der pathologischen Abteilung der Universitätsklinik Stavanger auf das Vorliegen von Entzündungsveränderungen und Dysplasien hin untersucht.

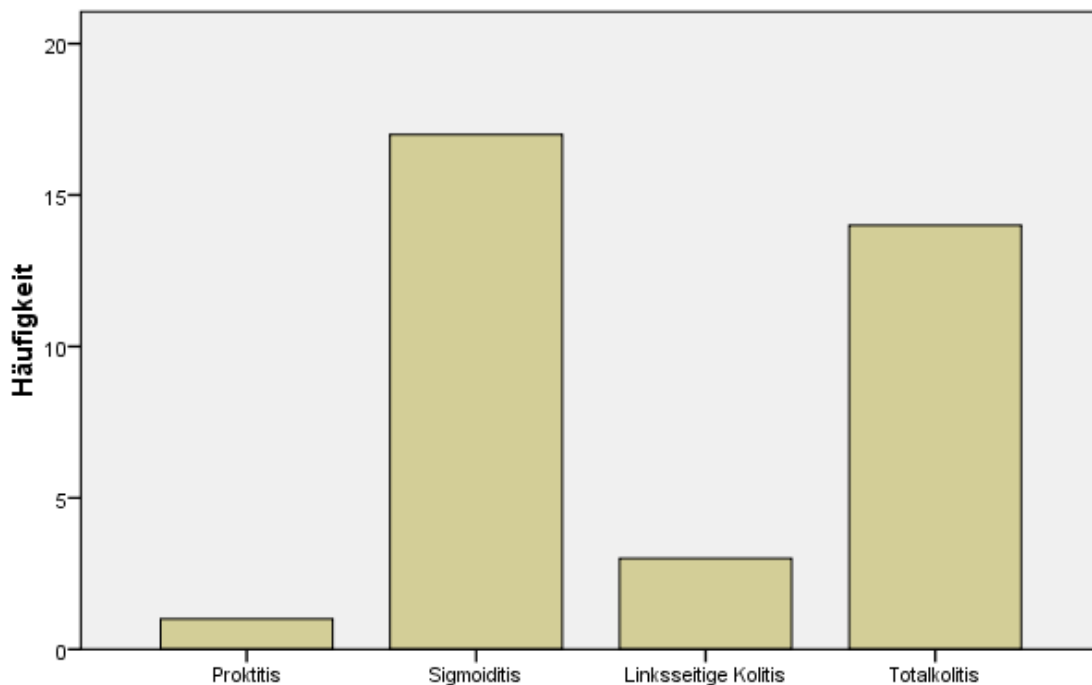


Abbildung 12: Krankheitsausdehnung bei Patienten mit CU.

Patient -Nr.	Alter (Jahre)	Geschlecht (m/w)	Diagnose	Krankheitsausdehnung
1	39	m	Colitis ulcerosa	Sigmoiditis
2	26	w	Colitis ulcerosa	Sigmoiditis
3	49	w	Colitis ulcerosa	Totalkolitis
4	28	w	Colitis ulcerosa	Totalkolitis
5	51	w	Colitis ulcerosa	Sigmoiditis
6	20	w	Colitis ulcerosa	Proktitis
7	20	w	Mb. Crohn	Terminale ileum
8	35	w	Colitis ulcerosa	Totalkolitis
9	57	w	Colitis ulcerosa	Totalkolitis
10	34	m	Mb. Crohn	Totalkolitis ohne Rektum
11	28	m	Colitis ulcerosa	Totalkolitis
12	32	w	Mb. Crohn	Aftöse Ulcera linke Flexur
13	27	w	Colitis ulcerosa	Sigmoiditis
14	74	m	Colitis ulcerosa	Sigmoiditis
15	38	w	Colitis ulcerosa	Totalkolitis
16	44	w	Colitis ulcerosa	Proktitis
17	41	m	Colitis ulcerosa	Sigmoiditis
18	35	w	Colitis ulcerosa	Linksseitige Kolitis
19	37	w	Colitis ulcerosa	Sigmoiditis
20	18	m	Mb. Crohn	Terminale ileum
21	41	m	Colitis ulcerosa	Linksseitige Kolitis
22	58	m	Colitis ulcerosa	Sigmoiditis
23	27	m	Colitis ulcerosa	Linksseitige Kolitis
24	25	w	Colitis ulcerosa	Totalkolitis
25	67	m	Colitis ulcerosa	Totalkolitis
26	35	m	Colitis ulcerosa	Sigmoiditis
27	29	m	Colitis ulcerosa	Totalkolitis
28	57	m	Colitis ulcerosa	Sigmoiditis
29	36	m	Colitis ulcerosa	Totalkolitis
30	42	w	Colitis ulcerosa	Totalkolitis
31	44	w	Colitis ulcerosa	Sigmoiditis
32	32	w	Colitis ulcerosa	Sigmoiditis
33	39	m	Colitis ulcerosa	Sigmoiditis
34	38	m	Colitis ulcerosa	Totalkolitis
35	42	w	Colitis ulcerosa	Sigmoiditis
36	25	m	Colitis ulcerosa	Linksseitige Kolitis
37	27	w	Colitis ulcerosa	Totalkolitis
38	21	m	Colitis ulcerosa	Totalkolitis
39	34	w	Colitis ulcerosa	Linksseitige Kolitis

Tabelle 13: Alter, Geschlecht, Diagnose und Krankheitsausdehnung der, in die Studie aufgenommenen, 39 Patienten.

In Tab. 13 auf S. 73 sind alle in die Studie aufgenommen Patienten mit Alter, Geschlecht, Diagnose und Krankheitsausdehnung aufgeführt. Die Diagnose wurde aufgrund des endoskopischen Befundes gestellt und durch die histologische Untersuchung bestätigt. Bei allen Patienten lag eine negative Stuhlprobe auf darmpathogene Bakterien und *Clostridium difficile* vor. Des Weiteren wurden die Biopsate auf Anzeichen einer CMV-Infektion hin untersucht. Diese konnte in keinem der Fälle nachgewiesen werden.

5.1.1 Klinische und endoskopische Befunde

Im Rahmen der Aufnahmeuntersuchung wurden bei jedem Patienten eine Vielzahl von Laborparametern und klinischer Daten erfasst (siehe Aufnahmeformular im Anhang). Tab. 14 auf Seite 75 gibt eine Übersicht über die gemessenen Entzündungsparameter. Bei allen Patienten wurde das fäkale Calprotektin in einer Stuhlprobe bestimmt. Es stellt einen Marker für den Grad der Entzündungsaktivität der Darmschleimhaut dar. Das fäkale Calprotektin war im Median mit 851 mg/kg (16 - 9716) deutlich erhöht. Die Standardabweichung lag bei 1777,78. Die Werte waren nicht normalverteilt.

Mit Hilfe des Symptomscores sollte das subjektive Krankheitsgefühl der Patienten erfasst und veranschaulicht werden. Er lag im Median bei 7 (1 - 14) mit einer Standardabweichung von 3,43. Die relativ große Spannweite des Symptomscores erklärt sich teilweise damit, dass ein Teil der Patienten schon vor der Aufnahme in die Studie mit einer medikamentellen Behandlung begonnen hatte. Zum Zeitpunkt der Aufnahmeuntersuchung lagen dann schon weniger klinische Symptome vor. Mit einer Signifikanz von $p = 0,292$ im Test nach Shapiro-Wilk lag eine Normalverteilung der Resultate vor. Die makroskopische Beurteilung der Entzündungsaktivität durch den Endoskopeur erfolgte mit Hilfe des Endoskopiescores, der die Entzündungsveränderungen in vier Entzündungsgrade einteilt. Alle Endoskopien wurden durch den Doktoranden selbst durchgeführt und sind dadurch vergleichbar. Der Endoskopiescore lag im Median bei 2 (0 – 3) . Die Werte waren nicht normalverteilt.

Patient -Nr.	Calprotektin (mg/kg)	Leukozyten (10 ⁹ /l)	CRP (mg/l)	Symptom- score	Endoskopie- score
1	272	4,20	0	3	2
2	681	5,20	2	3	1
3	1497	10,00	15	12	2
4	851	7,80	4	6	2
5	203	2,80	1	7	2
6	23	7,30	2	3	2
8	9716	10,00	1	10	2
9	907	14,80	27	8	2
11	1624	6,90	4	4	2
13	413	4,60	1	2	1
14	1126	8,50	11	2	2
15	1090	7,70	14	5	2
16	20	10,50	27	5	2
17	707	8,20	11	12	2
18	977	7,70	0	9	2
19	454	10,40	51	8	2
21	707	10,70	11	9	2
22	1313	7,10	3	1	1
23	31	11,30	7	8	1
24	1435	12,80	16	7	2
25	2173	11,20	24	11	3
26	2014	9,50	1	2	2
27	2016	5,90	15	5	2
28	16	8,40	0	1	1
29	659	7,90	18	10	2
30	2767	11,50	35	8	2
31	364	8,70	4	10	1
32	4852	4,90	6	6	2
33	1173	5,50	2	8	2
34	526	6,20	3	5	2
35	76	7,10	13	2	1
36	5096	5,50	63	8	3
37	997	9,60	4	7	1
38	761	9,00	47	9	1
39	73	8,60	40	14	3
M	851	8,23	13,77	7,00	1,83
S	1871,04	2,60	16,21	3,43	0,57
SEM	316,26	0,44	2,74	0,580	0,096

Tabelle 14: Klinische und endoskopische Parameter. *M* = Median, *S* = Standardabweichung, *SEM* = Standardfehler des Mittelwertes.

5.1.2 Histologische Ergebnisse

Eine Übersicht über die Verteilung der durch die histologische Untersuchung gefundenen Grad der Entzündungsaktivität ist in Tab. 15 aufgeführt. Alle Krankproben zeigten histologisch nachweisbare Entzündungsveränderungen. Bei den Referenzproben waren 18 Gewebeproben normal, bei den restlichen lag eine milde oder moderate Entzündung vor. In beiden Gruppen konnten keine Dysplasieveränderungen nachgewiesen werden,

Histologische Entzündungsaktivität	Krankprobe	Referenzprobe
Keine	n = 0	n = 18
Mild	n = 14	n = 11
Moderat	n = 17	n = 6
Stark	n = 4	n = 0
Dysplasie	n = 0	n = 0

Tabelle 15: Histologische Entzündungsaktivität nach der Untersuchung durch den Pathologen.

Tab. 16 auf S. 77 zeigt die Ergebnisse der histologischen Untersuchung der einzelnen Patienten. Sie veranschaulicht, wie sich die Krankprobe von der zugehörigen Patient-internen Referenzprobe im Grad der Entzündungsaktivität unterschieden. Dies ist für die spätere Deutung der Ergebnisse der Genexpression der untersuchten MMPs von Bedeutung. Die ideale Konstellation stellte eine geringe/normale Entzündungsaktivität der Referenzprobe und eine möglichst starke Entzündungsaktivität in der Krankprobe dar. Bei 25 Patienten lag die zuletzt beschriebene Konstellation vor und die Entzündungsaktivität der Krankprobe war bei ihnen histologisch gesehen stärker ausgeprägt als die der Referenzprobe. Bei neun Patienten lag die gleiche Entzündungsaktivität vor und bei einem Patienten zeigte die Referenzprobe eine höhere Entzündungsaktivität als die Krankprobe.

Patient-Nr.	Histologie Referenzprobe	Histologie Krankprobe
1	Keine Entzündung	Moderate Entzündung
2	Keine Entzündung	Milde Entzündung
3	Milde Entzündung	Milde Entzündung
4	Moderate Entzündung	Moderate Entzündung
5	Keine Entzündung	Milde Entzündung
6	Keine Entzündung	Milde Entzündung
8	Milde Entzündung	Starke Entzündung
9	Moderate Entzündung	Moderate Entzündung
11	Moderate Entzündung	Moderate Entzündung
13	Keine Entzündung	Milde Entzündung
14	Keine Entzündung	Starke Entzündung
15	Moderate Entzündung	Moderate Entzündung
16	Milde Entzündung	Moderate Entzündung
17	Keine Entzündung	Moderate Entzündung
18	Keine Entzündung	Milde Entzündung
19	Keine Entzündung	Moderate Entzündung
21	Keine Entzündung	Moderate Entzündung
22	Keine Entzündung	Moderate Entzündung
23	Milde Entzündung	Moderate Entzündung
24	Milde Entzündung	Milde Entzündung
25	Moderate Entzündung	Milde Entzündung
26	Keine Entzündung	Milde Entzündung
27	Milde Entzündung	Moderate Entzündung
28	Keine Entzündung	Milde Entzündung
29	Milde Entzündung	Starke Entzündung
30	Milde Entzündung	Milde Entzündung
31	Keine Entzündung	Milde Entzündung
32	Keine Entzündung	Moderate Entzündung
33	Keine Entzündung	Starke Entzündung
34	Milde Entzündung	Milde Entzündung
35	Milde Entzündung	Moderate Entzündung
36	Keine Entzündung	Moderate Entzündung
37	Milde Entzündung	Moderate Entzündung
38	Moderate Entzündung	Moderate Entzündung
39	Keine Entzündung	Leichte Entzündung

Tabelle 16: Patientinterne Übersicht über die histologische Entzündungsaktivität in den Krank- und Referenzproben der Patienten mit CU.

5.2 Bestimmung der MMP-Genexpression

Wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, wurde die Genexpression der untersuchten MMPs mittels Real-Time PCR bestimmt. Für jede MMP wurden die Krank- und Referenzproben jeweils doppelt analysiert und die Mittelwerte berechnet.

Die Messwerte wurden dann mit Hilfe der in jeder Probe zusätzlich bestimmten Genexpression des Housekeeping-Gens (18sRNA) normiert. Dabei wurde der Wert für die relative Genexpression des Housekeeping-Gens von dem Wert der MMP-Expression abgezogen. Zusätzlich wurde dieses Ergebnis auf die jeweilige patientinterne Referenzprobe bezogen. Dieses mathematische Modell wurde 2001 von Pfaffl beschrieben und wird als $\Delta\Delta Ct$ bezeichnet¹³⁵.

$$\Delta\Delta Ct = \frac{\text{Genexpression Krankprobe MMP} - \text{Genexpression 18sRNA}}{\text{Genexpression Referenzprobe MMP} - \text{Genexpression 18sRNA}}$$

Tab. 17 auf S. 79 zeigt die berechneten $\Delta\Delta Ct$ -Werte der von uns untersuchten MMPs. Dabei stellen die angegebenen Werte den Faktor dar, um den sich die Genexpression der Krankprobe von der Patient-internen Referenzprobe unterscheidet.

Bei Werten größer als 1 ist die Genexpression um diesen Faktor erhöht, bei Werten kleiner als 1 dementsprechend erniedrigt. Bei Werten gleich 1 ist die Genexpression unverändert.

Bei einem Patienten (Patient Nr. 1) lag die Proteinmenge von MMP-7 unter der Nachweisgrenze und es konnte deshalb kein Wert bestimmt werden.

Die in der Tab. 17 gezeigten Ergebnisse stellten die Grundlage für die in den Abb. 13 bis 23 graphisch dargestellten statistischen Analysen dar.

Patient -Nr.	MMP-1 Path.	MMP-7 Path.	MMP-13 Path.	MMP-19 Path.	MMP-28 Path.
1	178,53	n.n.	0,89	9,75	0,17
2	9,03	0,89	3,99	0,88	0,17
3	1,78	0,46	0,68	0,77	0,29
4	1,25	1,27	1,21	1,55	0,83
5	2,62	744,43	5,28	5,54	0,26
6	245,57	124,93	10,67	11,67	0,99
8	102,54	125,37	5,96	3,84	0,51
9	0,75	0,64	0,38	0,81	0,44
11	1,32	1,40	2,35	1,27	1,03
13	4,71	0,41	1,24	0,62	0,30
14	84,45	114,56	1,56	4,71	0,36
15	1,72	0,23	1,02	0,32	0,22
16	4,61	249,00	3,19	10,48	1,27
17	60,55	18,06	3,06	1,39	0,64
18	0,94	1,57	2,88	2,03	0,21
19	112,21	28,54	20,53	5,22	0,71
21	1 013,41	294,07	99,04	20,75	0,24
22	2,01	29,75	10,56	2,51	0,34
23	10,52	85,63	5,88	5,31	0,78
24	2,98	1,08	0,99	0,51	0,58
25	1,47	3,92	3,66	0,52	0,74
26	123,64	1 093,70	197,40	13,41	0,48
27	560,28	55,33	38,99	48,50	0,86
28	2,50	299,21	9,22	2,37	1,69
29	2 967,43	5 595,30	74,80	20,53	0,64
30	7,97	1,62	28,74	2,03	0,88
31	181,65	365,82	32,90	3,19	1,86
32	0,08	201,55	0,20	0,43	0,20
33	18,25	62,90	6,75	6,21	0,27
34	1,95	18,38	0,62	0,37	0,07
35	0,67	46,69	5,96	3,17	0,63
36	37,27	127,12	14,72	0,30	0,52
37	16,51	3,14	24,76	4,53	1,60
38	0,26	1,19	0,87	0,36	1,14
39	91,77	2,06	8,28	5,98	0,12
M	7,97	29,15	5,28	2,51	0,52
S	524,48	965,81	37,72	9,12	0,46
SEM	88,65	165,64	6,38	1,54	0,08

Tabelle 17: Relative, nach $\Delta\Delta\text{Ct}$ normierte Genexpression der MMPs bei CU. *M* = Median, *S* = Standardabweichung, *SEM* = Standardfehler des Mittelwertes.

5.2.1 Relative Genexpression von MMP-1

In Abb. 13 ist die relative Genexpression von MMP-1 in den Krankproben im Vergleich zu den Referenzproben dargestellt. Die relative Genexpression in den Krankproben lag im Median bei 7,97. Das bedeutet, dass die Expression von MMP-1 im stärker entzündlich veränderten Gewebe im Median achtmal höher war als in den Referenzproben.

Die statistische Signifikanzberechnung wurde mit dem zweiseitigen Wilcoxon Rangsummen Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Dabei wurde jede Krankprobe mit der zum gleichen Patienten gehörenden Referenzprobe verglichen. Die relative Genexpression der Krankproben war gegenüber den Referenzproben hochsignifikant ($p < 0,001$) erhöht.

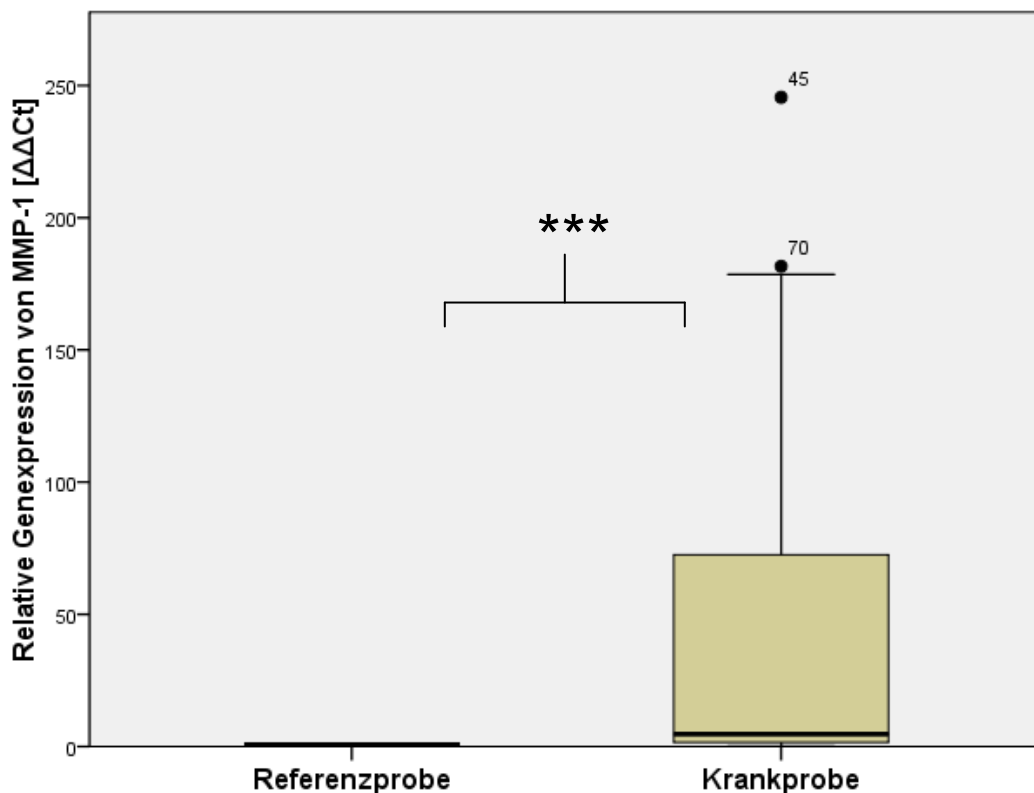


Abbildung 13: Relative MMP-1 Genexpression der Krankproben bezogen auf die Referenzproben (Wert = 1). Die Genexpression ist als $\Delta\Delta Ct$, normiert auf das Housekeeping-Gen 18sRNA und die patientinterne Referenzprobe, dargestellt. Die Genexpression von MMP-1 ist in der Krankprobe hochsignifikant mit $p < 0,001$ erhöht.

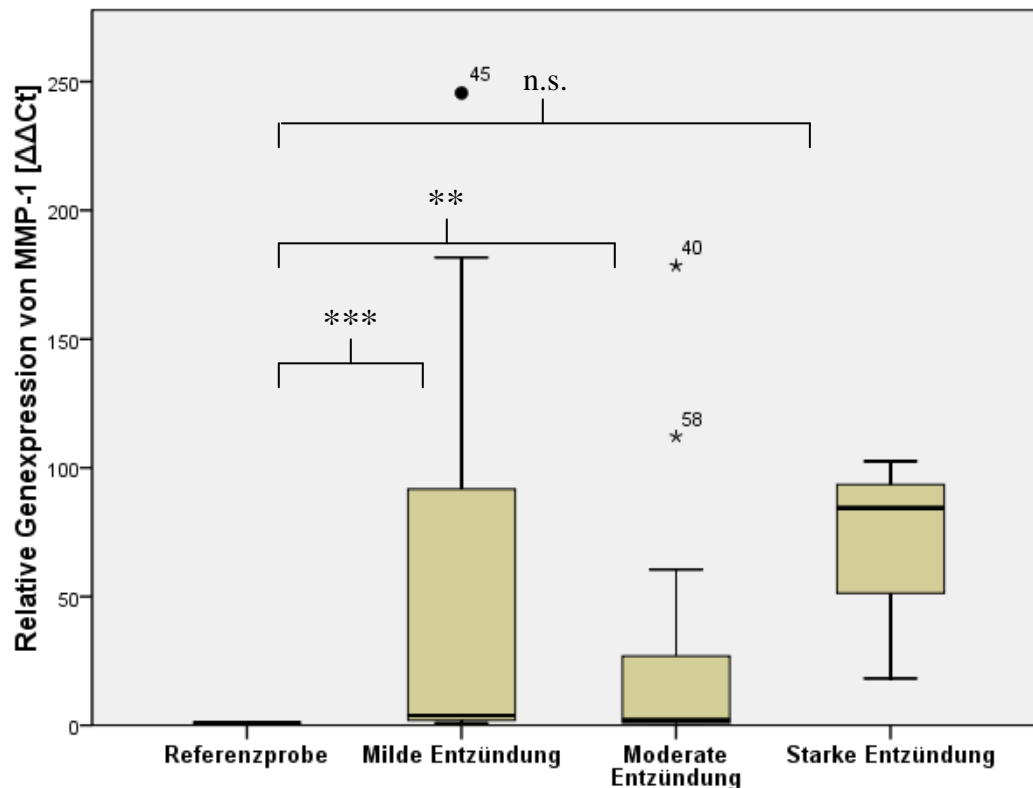


Abbildung 14: Relative Genexpression ($\Delta\Delta C_t$) von MMP-1, differenziert nach der histologischen Entzündungsaktivität der Krankproben. Die Expression von MMP-1 war bei Vorliegen einer milden Entzündung ($p < 0,001$) und bei moderater Entzündung ($p = 0,006$) hochsignifikant erhöht. Bei starker Entzündung war die Erhöhung nicht signifikant (n.s., $p = 0,068$).

Zusätzlich zur Gesamtpopulation der Krankproben haben wir die Subgruppen mit unterschiedlicher Entzündungsaktivität auf die Veränderung der Genexpression hin untersucht. Bei den Krankproben mit der histologischen Diagnose „milde Entzündung“ war die relative Genexpression im Vergleich zu den Referenzproben im Median um das vierfache erhöht. Dieses Ergebnis war hochsignifikant. Bei moderater Entzündung lag die Erhöhung beim 4,6-fachen und war ebenfalls hochsignifikant (Abb. 14).

Die Erhöhung der Expression bei starker Entzündung lag im Median beim 93,5-fachen, und war damit deutlich erhöht. Aufgrund der geringen Fallzahl ($n = 4$) von Patienten mit der histologischen Diagnose „starke Entzündung“ lagen diese Ergebnisse jedoch knapp außerhalb des Signifikanzniveaus. Innerhalb der Subgruppen lag keine signifikanter Unterschied der Genexpression vor.

5.2.2 Relative Genexpression von MMP-7

Die relative Genexpression von MMP-7 war bei Vorliegen von Entzündungsveränderungen deutlich erhöht. In der Gesamtpopulation aller Krankproben lag die relative Genexpression von MMP-7 im Median um das 29,2-fache höher, als in den zugehörigen Referenzproben. Bei der statistischen Auswertung mit dem zweiseitigen Wilcoxon Rangsummen Test für verbundene Stichproben war diese Erhöhung hochsignifikant ($p < 0,001$). Abb. 15 stellt dieses Ergebnis graphisch dar.

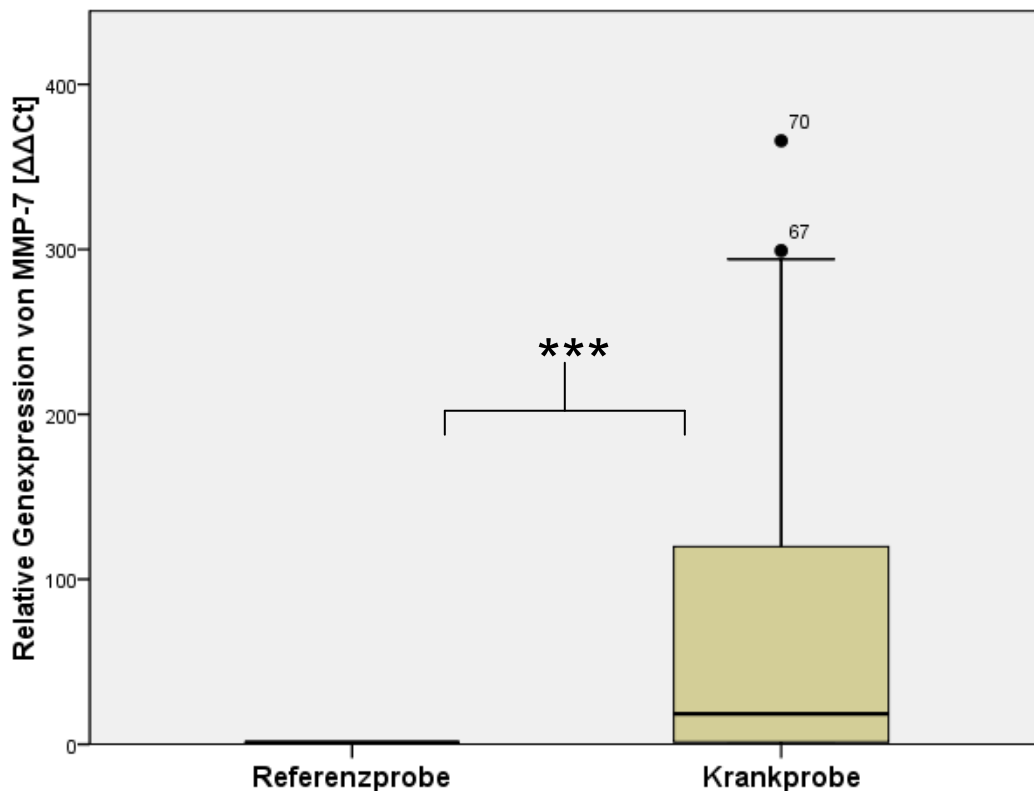


Abbildung 15: Relative Genexpression von MMP-7 in den Krankproben bezogen auf die Referenzproben (Wert = 1). Die Genexpression ist als $\Delta\Delta Ct$, normiert auf das Housekeeping-Gen 18sRNA und die patientinterne Referenzprobe, dargestellt. Die Genexpression von MMP-7 ist in den Krankproben hochsignifikant ($p < 0,001$) erhöht.

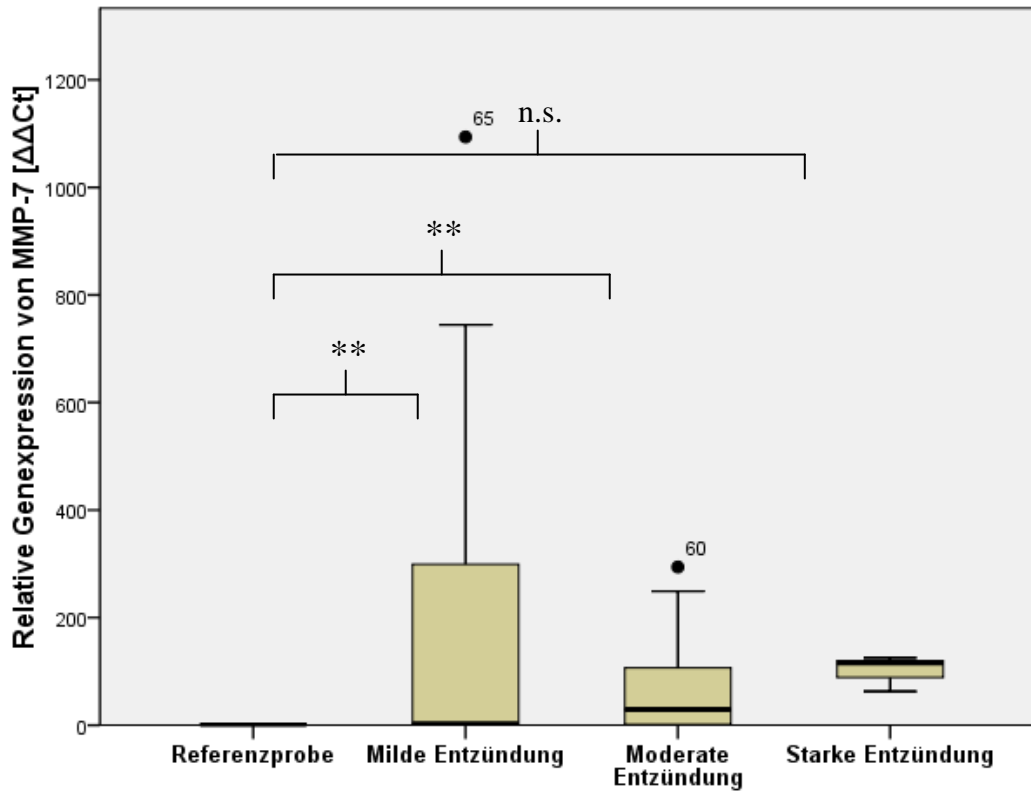


Abb. 16: Relative Genexpression ($\Delta\Delta C_t$) von MMP-7, differenziert nach der histologischen Entzündungsaktivität der Krankproben. Die Expression von MMP-7 war bei Vorliegen einer milden Entzündung ($p = 0,008$) und bei Vorliegen einer moderaten Entzündung hochsignifikant ($p = 0,002$) erhöht. Bei starker Entzündung war die Erhöhung nicht signifikant ($p = 0,068$).

Bei einer, nach der histologischen Diagnose differenzierten Untersuchung der Genexpression von MMP-7 bestätigte sich, dass der Median der Expressionserhöhung mit dem Grad der Entzündung ansteigt. Die Genexpression der Krankprobe war bei milder Entzündung im Median um das dreifache erhöht. Bei moderater Entzündung lag die Erhöhung im Median beim 29,15-fachen. In beiden Fällen lagen hochsignifikante Ergebnisse vor (Abb. 16).

Bei Vorliegen einer starken Entzündung war die Genexpression von MMP-7 deutlich um das 119,97-fache erhöht. Aufgrund der geringen Fallzahl von $n = 4$ Patienten war dieses Resultat aber nicht signifikant. Innerhalb der Subgruppen lag kein signifikanter Unterschied der Genexpression vor.

5.2.3 Relative Genexpression von MMP-13

Die Untersuchung der relativen Genexpression von MMP-13 mittels RT-PCR ergab eine, im Median um das 5,28-fache erhöhte, Genexpression in der Gesamtpopulation der Krankproben im Vergleich zu den Referenzproben (Abb. 17).

Bei der statistischen Auswertung mit dem zweiseitigen Wilcoxon Rangsummen Test für verbundene Stichproben war diese Erhöhung hochsignifikant ($p < 0,001$).

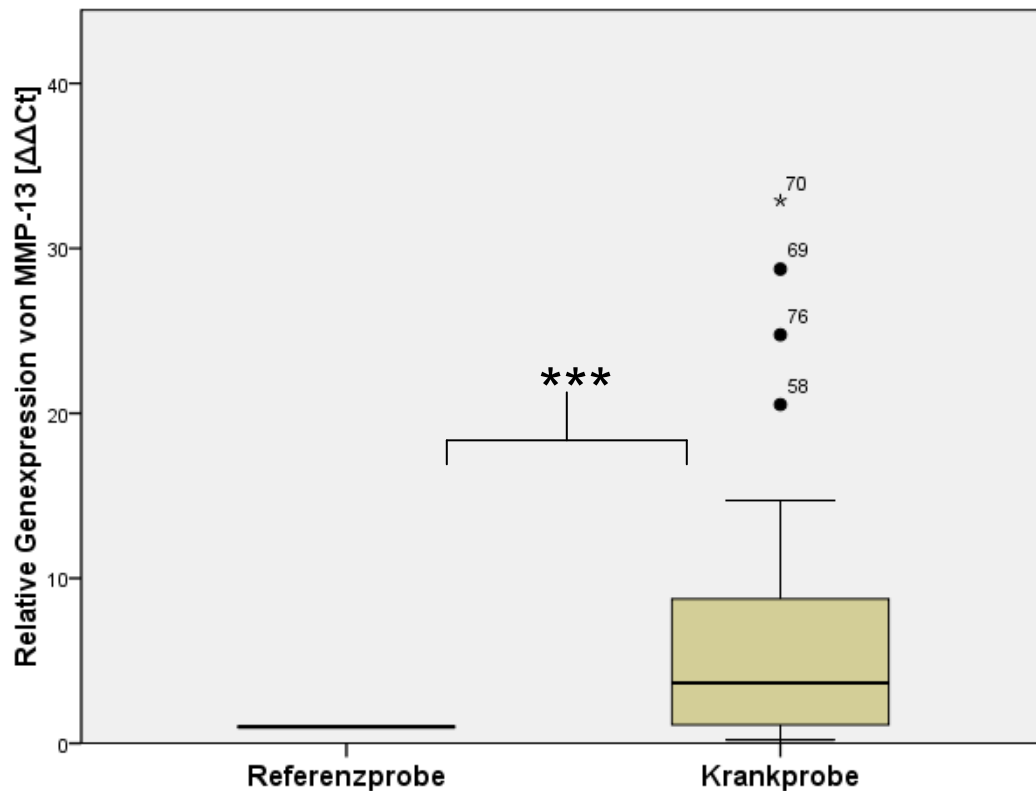


Abbildung 17: Relative Genexpression von MMP-13 aller Krankproben bezogen auf die Referenzproben (Wert = 1). Die Genexpression ist als $\Delta\Delta Ct$, normiert auf das Housekeeping-Gen 18sRNA und die patientinterne Referenzprobe, dargestellt. Die Genexpression von MMP-13 ist in den Krankproben hochsignifikant mit $p < 0,001$ erhöht.

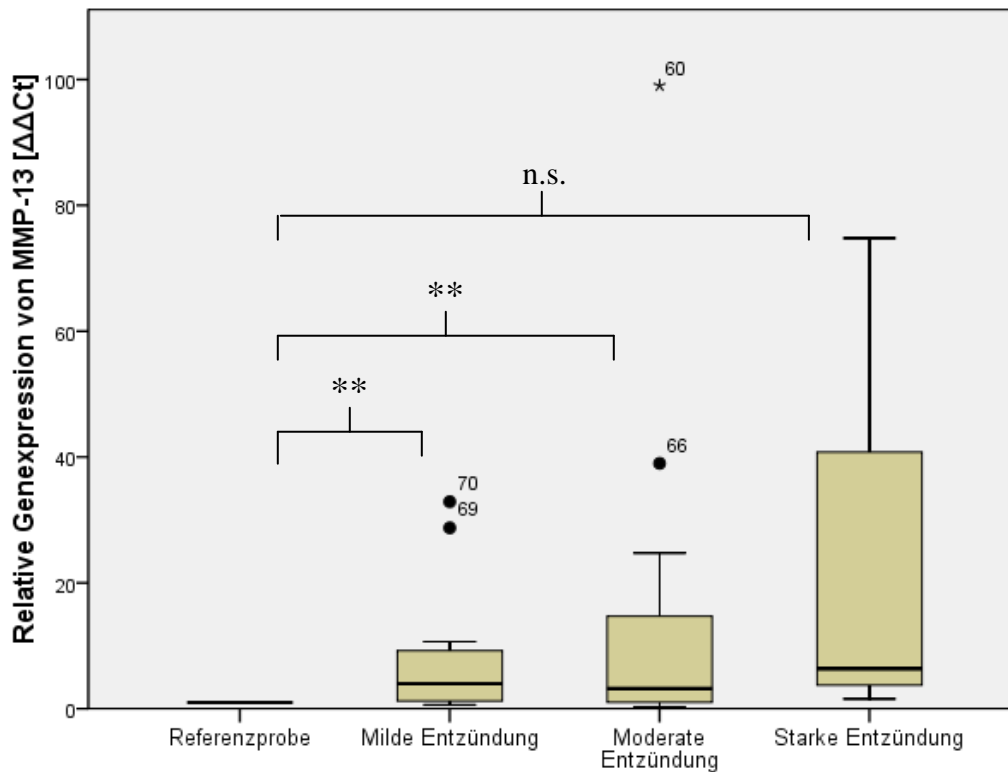


Abbildung 18: Relative Genexpression ($\Delta\Delta C_t$) von MMP-13, differenziert nach der histologischen Entzündungsaktivität der Krankproben. Die Expression von MMP-13 war bei Vorliegen einer milden Entzündung ($p = 0,005$) und bei Vorliegen einer moderaten Entzündung ($p = 0,004$) hochsignifikant erhöht. Bei starker Entzündung war die Erhöhung nicht signifikant (n.s., $p = 0,068$).

Bei der, nach der histologischen Diagnose differenzierten Betrachtung erfolgte ein hochsignifikanter Anstieg der Genexpression von MMP-13 bei Vorliegen von milder und moderater Entzündung. Die Genexpression der Krankproben war bei milder Entzündung im Median um das 4,64-fache erhöht. Bei moderater Entzündung lag die Erhöhung im Median beim 3,19-fachen (Abb. 18).

Bei Vorliegen einer starken Entzündung war die Genexpression von MMP-13 um das 6,36-fache erhöht. Aufgrund der geringen Fallzahl von $n = 4$ Patienten war dieses Resultat aber nicht signifikant abweichend. Innerhalb der Subgruppen lag kein signifikanter Unterschied der Genexpression vor.

5.2.4 Relative Genexpression von MMP-19

Die Untersuchung der relativen Genexpression von MMP-19 mittels RT-PCR ergab eine, im Median um das 2,51-fach erhöhte Genexpression in der Gesamtpopulation der Krankproben im Vergleich zu den Referenzproben (Abb. 19).

Bei der statistischen Auswertung mit dem zweiseitigen Wilcoxon Rangsummen Test für verbundene Stichproben war diese Erhöhung hochsignifikant ($p < 0,001$).

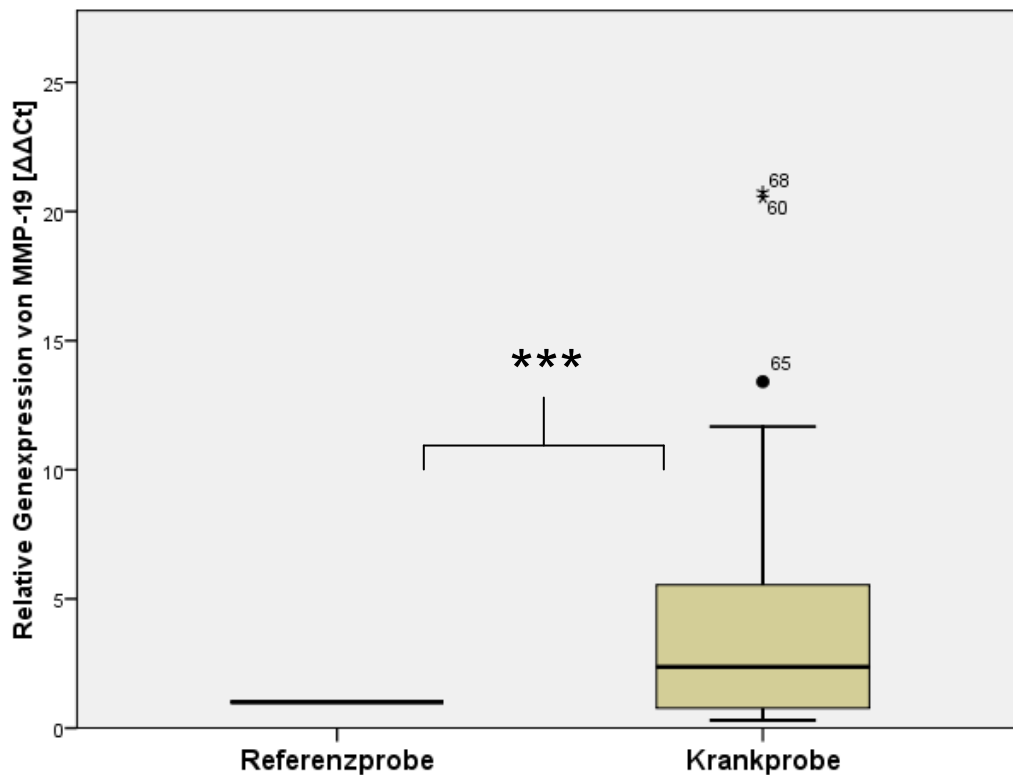


Abbildung 19: Relative Genexpression von MMP-19 aller Krankproben bezogen auf die Referenzproben (Wert = 1). Die Genexpression ist als $\Delta\Delta Ct$, normiert auf das Housekeeping-Gen 18s-RNA und die patientinterne Referenzprobe, dargestellt. Die Genexpression von MMP-19 ist in den Krankproben hochsignifikant mit $p < 0,001$ erhöht.

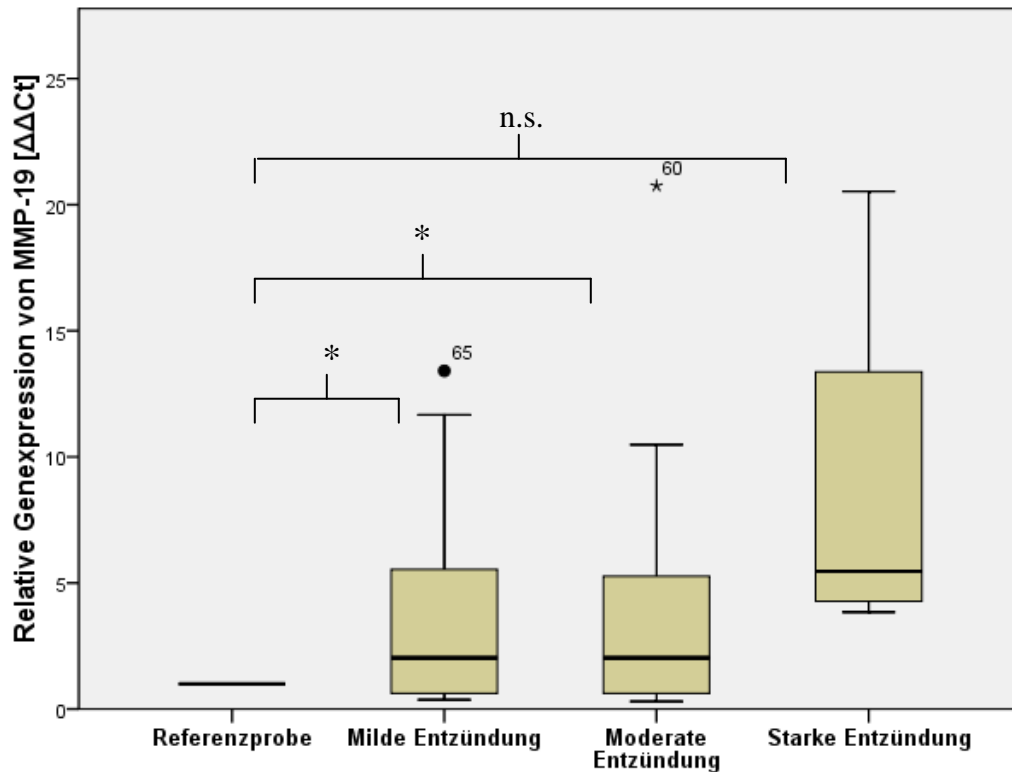


Abbildung 20: Relative Genexpression ($\Delta\Delta C_t$) von MMP-19, differenziert nach der histologischen Entzündungsaktivität der Krankproben. Die Expression von MMP-19 war bei Vorliegen einer milden Entzündung signifikant ($p = 0,048$) und bei Vorliegen einer moderaten Entzündung signifikant ($p = 0,019$) erhöht. Bei starker Entzündung war die Erhöhung nicht signifikant (n.s., $p = 0,068$).

Bei der nach dem histologischen Entzündungsgrad differenzierten Analyse erfolgte ein signifikanter Anstieg der Genexpression von MMP-19 bei Vorliegen von milder und von moderater Entzündung. Die Genexpression der Krankprobe war bei milder Entzündung im Median um das zweifache erhöht. Dies war statistisch signifikant ($p = 0,048$). Bei moderater Entzündung lag die Erhöhung im Median beim 2,51-fache. Auch in diesem Fall lag eine klare Signifikanz vor (Abb. 20).

Bei Vorliegen einer starken Entzündung war die Genexpression von MMP-19 im Median um das 5,46-fache erhöht. Aufgrund der geringen Fallzahl von $n = 4$ Patienten war dieses Resultat aber nicht signifikant. Innerhalb der Subgruppen lag kein signifikanter Unterschied der Genexpression vor.

5.2.5 Relative Genexpression von MMP-28

Die Untersuchung der relativen Genexpression von MMP-28 mittels RT-PCR ergab eine im Median um das 0,52-fach erniedrigte, relative Genexpression in der Gesamtpopulation der Krankproben im Vergleich zu den Referenzproben (Abb. 21).

Bei der statistischen Auswertung mit dem zweiseitigen Wilcoxon Rangsummen Test für verbundene Stichproben war diese Verminderung hochsignifikant ($p < 0,001$).

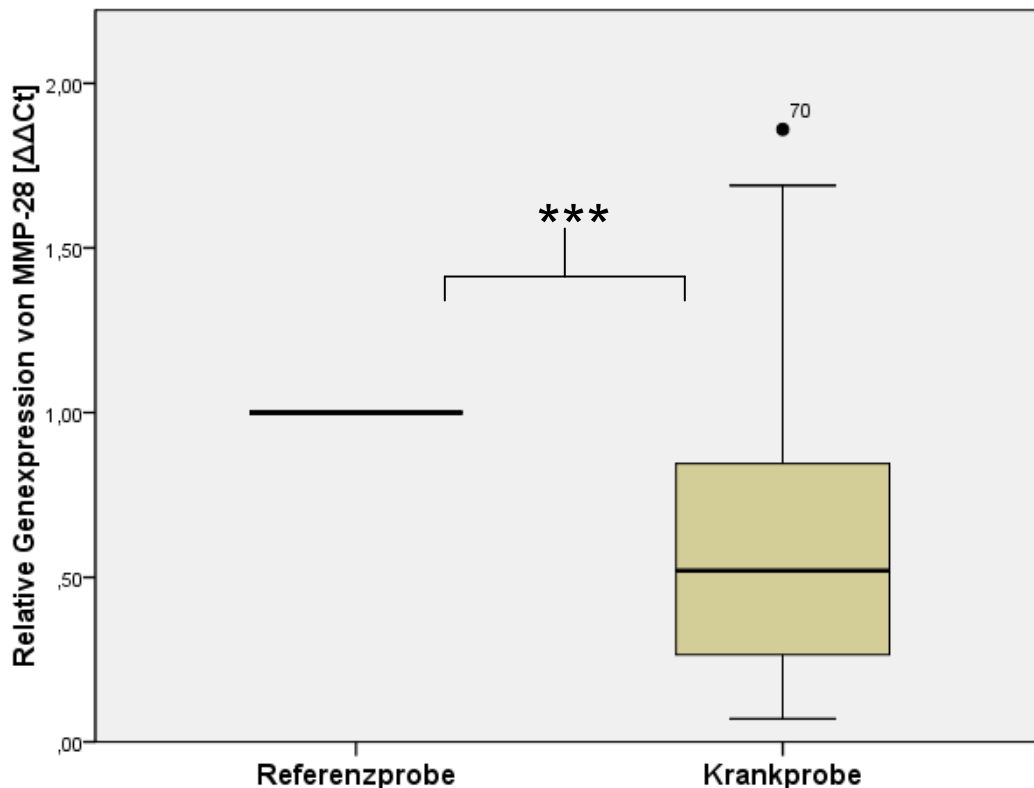


Abbildung 21: Relative Genexpression von MMP-28 aller Krankproben bezogen auf die Referenzproben (Wert = 1). Die Genexpression ist als $\Delta\Delta Ct$, normiert auf das Housekeeping-Gen 18sRNA und die patientinterne Referenzprobe, dargestellt. Die Genexpression von MMP-28 ist in den Krankproben hochsignifikant mit $p < 0,001$ erniedrigt.

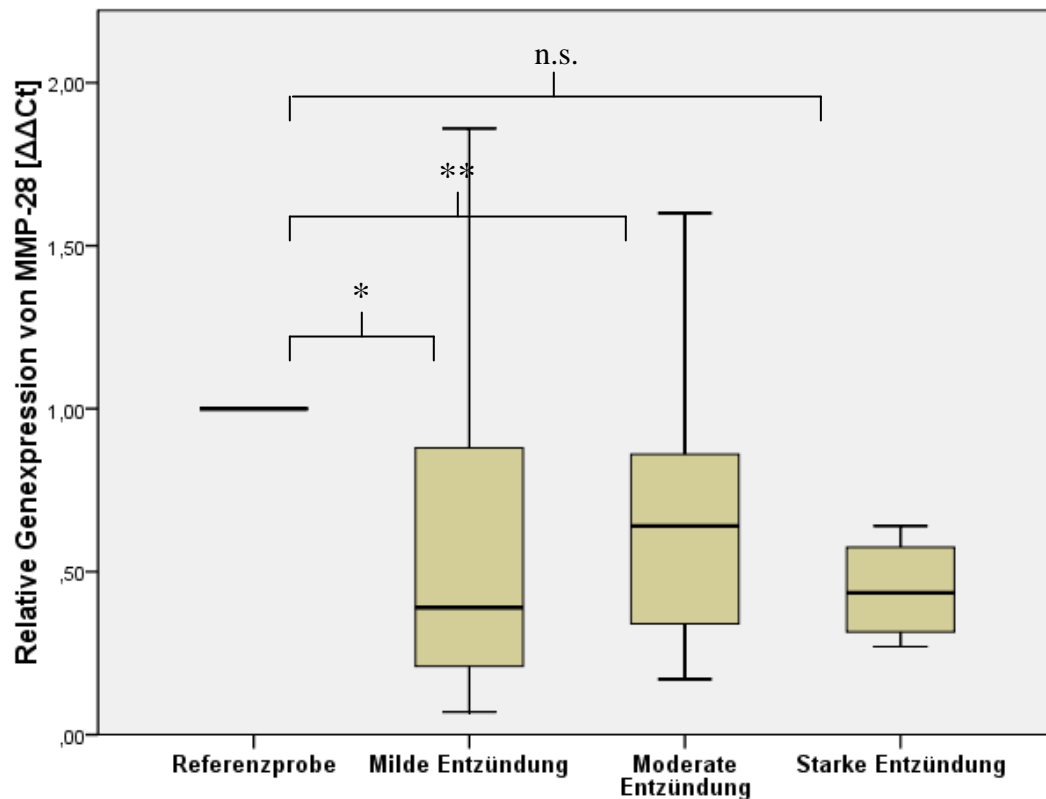


Abbildung 22: Relative Genexpression ($\Delta\Delta C_t$) von MMP-28, differenziert nach der histologischen Entzündungsaktivität der Krankproben. Die Expression von MMP-28 war bei Vorliegen einer milden Entzündung signifikant ($p = 0,030$) und bei Vorliegen einer moderaten Entzündung hochsignifikant ($p = 0,009$) erniedrigt. Bei starker Entzündung war die Erniedrigung nicht signifikant (n.s., $p = 0,068$).

Bei der nach dem histologischen Entzündungsgrad differenzierten Analyse erfolgte eine signifikante Herunterregulierung der Genexpression von MMP-28 bei Vorliegen von milder und moderater Entzündung. Die Genexpression in den Krankproben war bei milder Entzündung im Median um das 0,39-fache erniedrigt. Bei moderater Entzündung lag die Erniedrigung im Median beim 0,64-fachen. Dieser Unterschied war hochsignifikant (Abb. 22).

Bei Vorliegen einer starken Entzündung war die Genexpression von MMP-28 im Median um das 0,435-fache erniedrigt. Aufgrund der geringen Fallzahl von $n = 4$ Patienten war dieses Resultat nicht signifikant.

5.2.6 Übersicht aller mit RT-PCR untersuchten MMPs

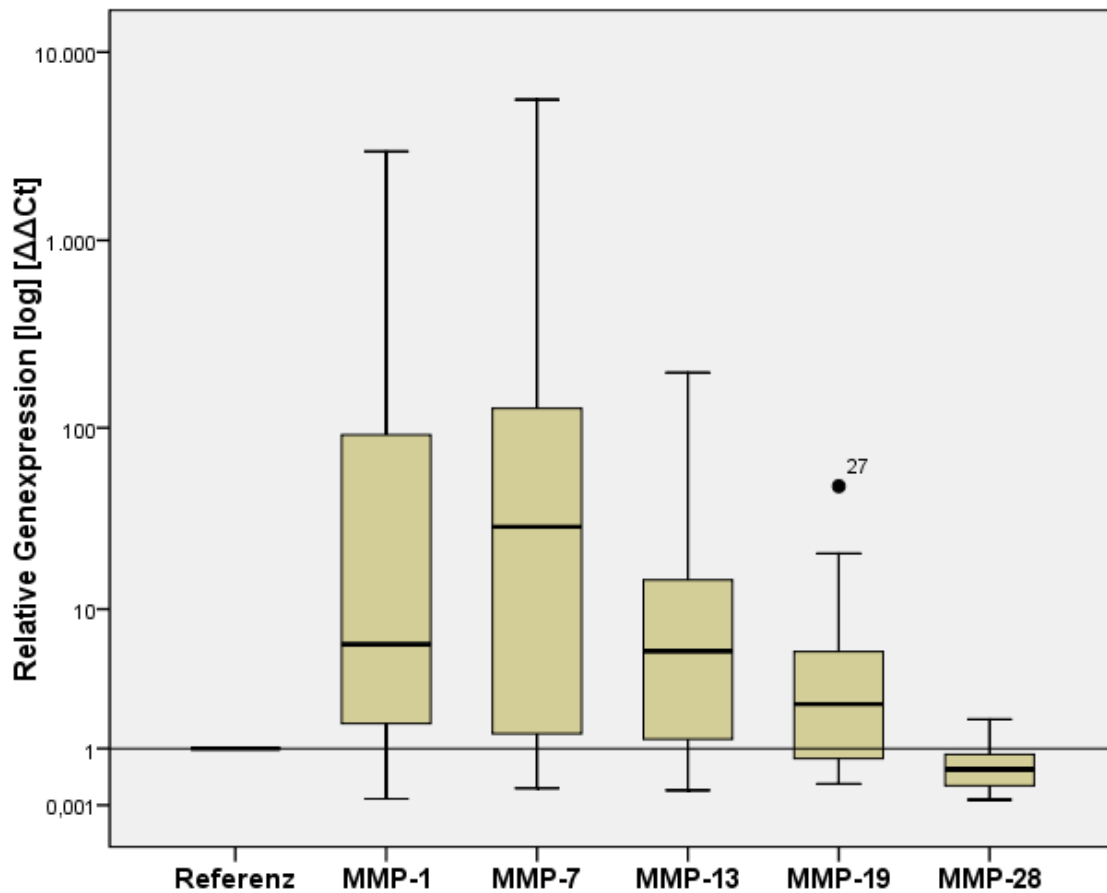


Abbildung 23: Übersicht aller mit RT-PCR untersuchten MMPs. Die relative Genexpression der MMPs der Krankproben wurde auf die jeweiligen Referenzproben bezogen. Diese besitzen deshalb den relativen Wert 1. Die Genexpression ist als $\Delta\Delta Ct$, normiert auf das Housekeeping-Gen 18sRNA und die Patient-interne Referenzprobe, dargestellt. Da die Werte zum Teil erhebliche Größenunterschiede zeigten, wurde zur besseren Übersicht die logarythmische Darstellung gewählt. Die relative Genexpression von MMP-1, -7, -13 und -19 war im Median hochsignifikant erhöht. Bei MMP-28 konnte eine hochsignifikante Erniedrigung der Genexpression nachgewiesen werden.

5.2.7 Quantitative Proteinbestimmung von MMP-7

Für MMP-7 haben wir mittels ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) die, in den Krank- und Referenzproben enthaltene Proteinmenge quantitativ bestimmt. Tab. 18 gibt eine Übersicht über die gemessenen Werte.

Patient-Nr.	Referenzprobe (ng/ml, pro 20 µg Gesamtprotein)	Krankprobe (ng/ml, pro 20 µg Gesamtprotein)
1	0,0265	0,1760
2	0,0540	0,1540
3	0,0880	0,1030
4	0,6170	0,9010
5	0,0975	0,2795
6	0,0370	0,1280
8	0,0410	0,4515
9	0,2280	0,3690
11	0,2795	0,4455
13	0,0300	0,0425
14	0,0500	0,2180
15	0,1400	0,1640
16	0,0390	0,2630
17	0,0225	0,1320
18	0,0370	0,0875
19	0,0480	0,4745
21	0,0050	0,3240
22	0,0215	0,2515
23	0,0190	0,5995
24	0,1765	0,1415
25	7,0855	2,0235
26	0,0050	2,7095
27	0,2990	0,5650
28	0,0365	0,1335
29	0,0320	0,6535
30	0,6215	1,0690
31	0,0395	1,3135
32	0,0050	0,4740
33	0,0190	0,6410
34	0,0680	1,6690
35	0,0135	1,0040
36	0,0645	0,5800
37	0,3485	0,4255
38	0,8605	1,4190
39	0,0295	0,1890
<i>M</i>	<i>0,0410</i>	<i>0,4255</i>
<i>S</i>	<i>1,1921</i>	<i>0,6044</i>
<i>SEM</i>	<i>0,2015</i>	<i>0,1022</i>

Tabelle 18: Quantitative Proteinbestimmung von MMP-7. Alle Proben wurden doppelt analysiert und die angegebenen Werte stellen die aus ihnen berechneten Mittelwerte dar.

Die quantitative Proteinbestimmung von MMP-7 mittels ELISA ergab in den Referenzproben im Median einen Proteingehalt von 0,041 ng/ml je 20 µg Gesamtprotein. In der Gesamtpopulation der Krankproben lag der Proteingehalt von MMP-7 im Median bei 0,426 ng/ml je 20 µg Gesamtprotein und war damit um das ca. 10-fache erhöht (Abb. 24).

Bei der statistischen Auswertung mit dem zweiseitigen Wilcoxon Rangsummen Test für verbundene Stichproben war diese Erhöhung hochsignifikant ($p < 0,001$).

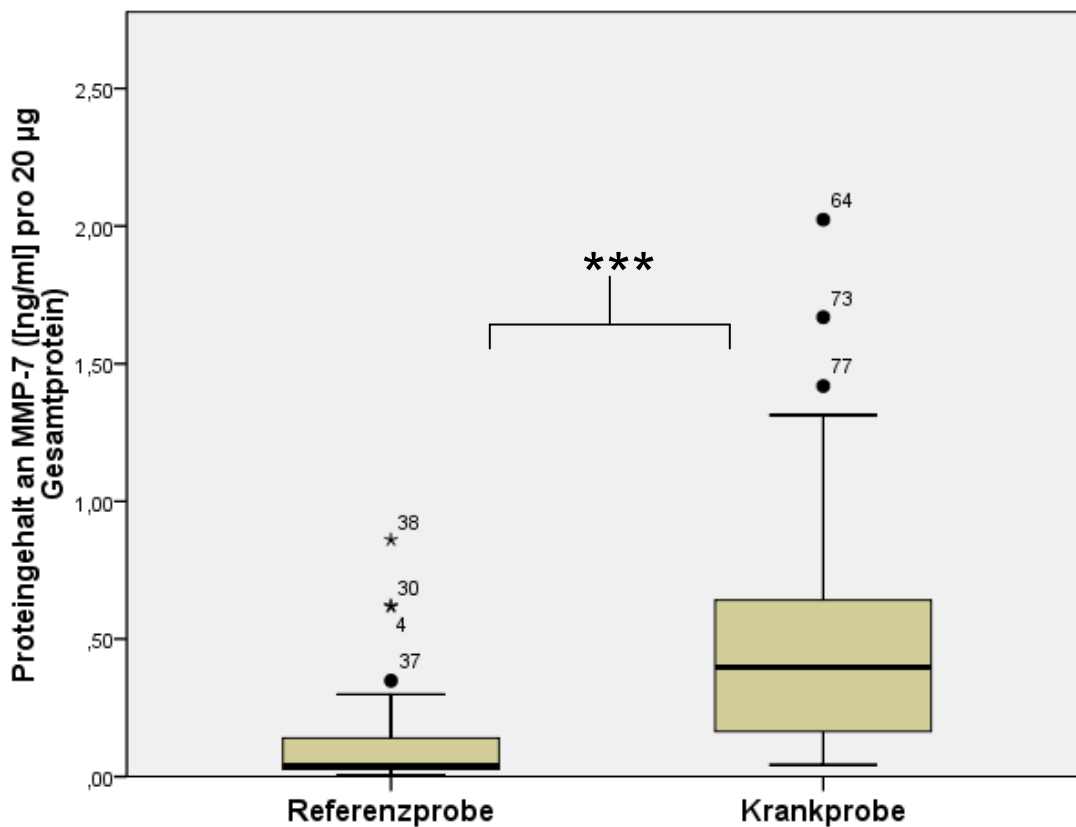


Abbildung 24: Proteingehalt der Referenz- und Krankproben an MMP-7. Die Analyse erfolgte mittels ELISA und gibt den Proteingehalt an MMP-7, pro 20 µg in den Proben enthaltenes Gesamtprotein, an. Der Proteingehalt an MMP-7 war in den Krankproben hochsignifikant ($p < 0,001$) erhöht.

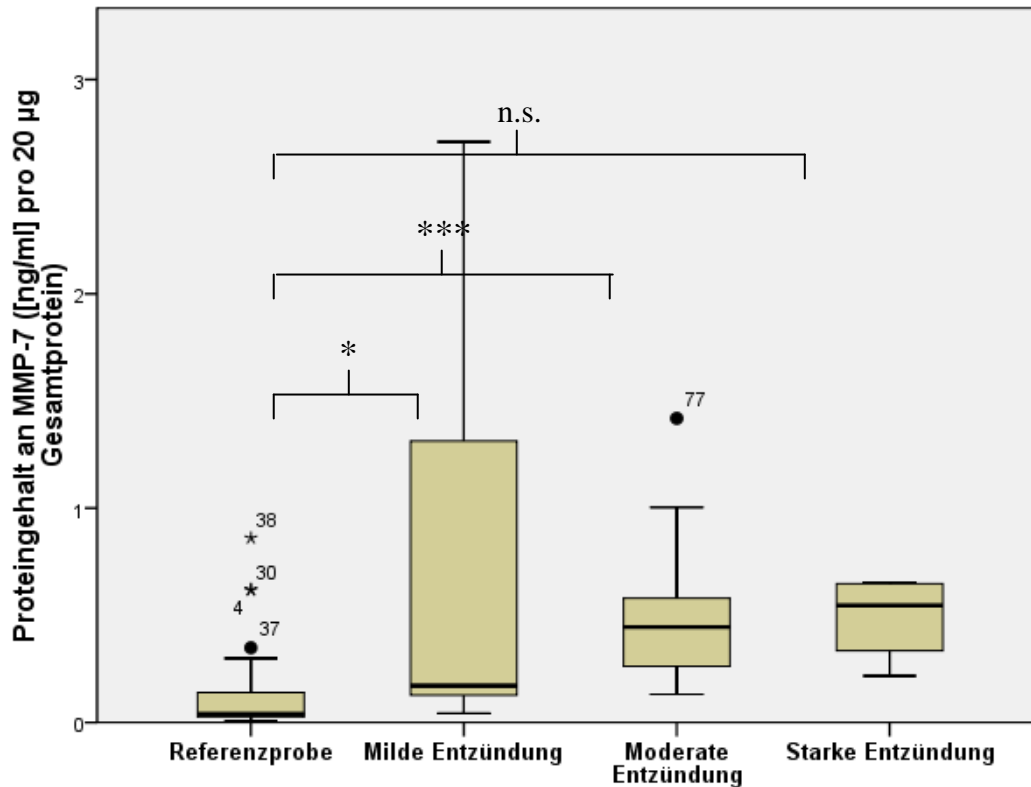
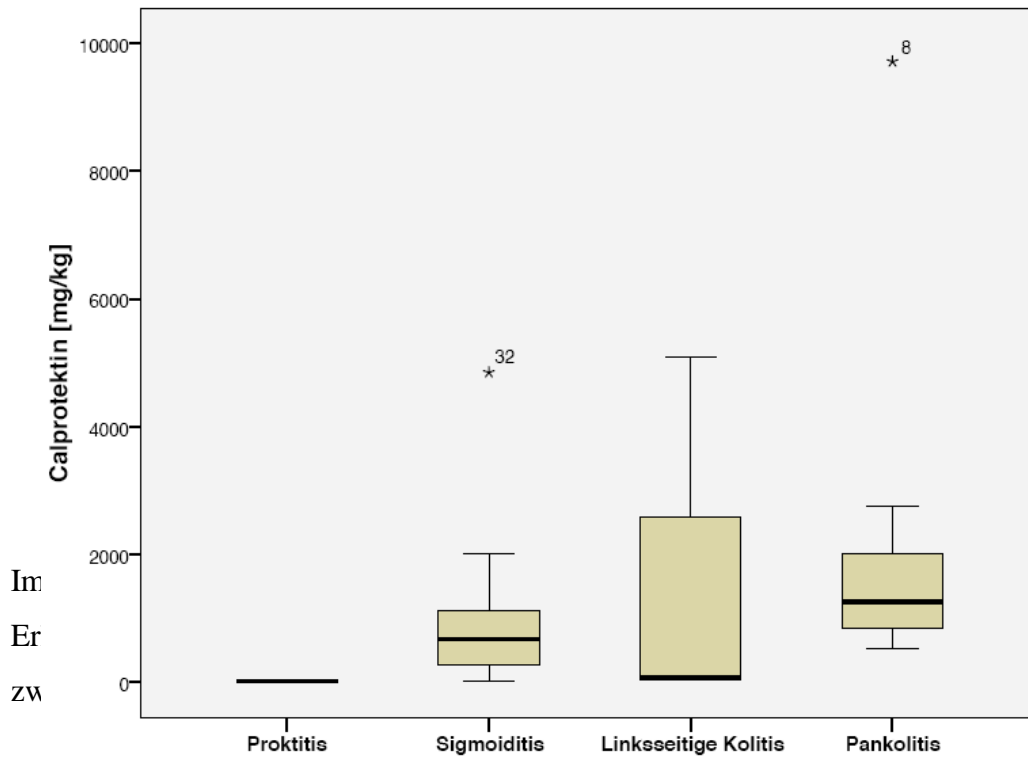
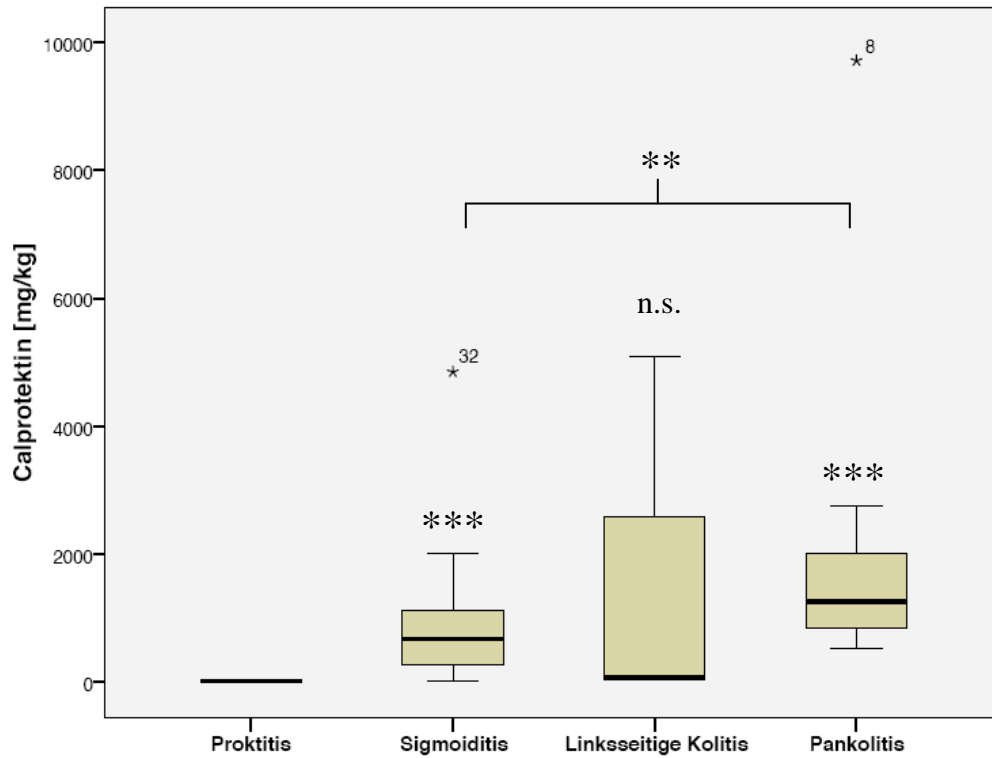


Abbildung 25: Proteingehalt an MMP-7 der Refrenz- und den, nach der histologischen Entzündungsaktivität differenzierten, Krankproben. Die Analyse erfolgte mittels ELISA und gibt den Proteingehalt an MMP-7, pro 20 µg in den Proben enthaltenes Gesamtprotein, an. Der Proteingehalt an MMP-7 war in den Krankproben mit milder Entzündung signifikant ($p = 0,026$) und bei moderater Entzündung hochsignifikant ($p < 0,001$) erhöht. Bei Vorliegen einer starken Entzündung war die Erhöhung nicht signifikant ($p = 0,068$)

Bei der nach der histologischen Entzündungsaktivität differenzierten Betrachtung des Proteingehaltes von MMP-7 in den Referenz- und Krankproben stieg die Proteinmenge parallel mit der Entzündungsaktivität an. Im Median lag die Proteinmenge von MMP-7 in den Referenzproben bei 0,041 ng/ml je 20 µg Gesamtprotein (Abb. 25). In der Gruppe mit milder Entzündung stieg der MMP-7-Proteingehalt im Median ca. um das 4,2-fache auf 0,172 ng/ml je 20 µg Gesamtprotein. Diese Erhöhung war signifikant. Bei Vorliegen einer moderaten Entzündung konnte eine hochsignifikante Erhöhung mit einem Anstieg des Medians um das 11-fache auf 0,45 ng/ml je 20 µg Gesamtprotein gemessen werden.

In der Gruppe mit histologisch starker Entzündungsveränderung konnte eine deutliche Erhöhung der MMP-7-Proteinmenge mit einem Median von 0,546 ng/ml je 20 µg Gesamtprotein gefunden werden. Dies entsprach der 13-fachen Proteinmenge im Vergleich zu den Referenzproben. Aufgrund der geringen Fallzahl von Patienten mit starken Entzündungsveränderungen in der Krankprobe (n = 4) war diese Erhöhung allerdings nicht statistisch signifikant. Innerhalb der Subgruppen lag kein signifikanter Unterschied der Genexpression vor.

5.2.8 Fäkales Calprotektin



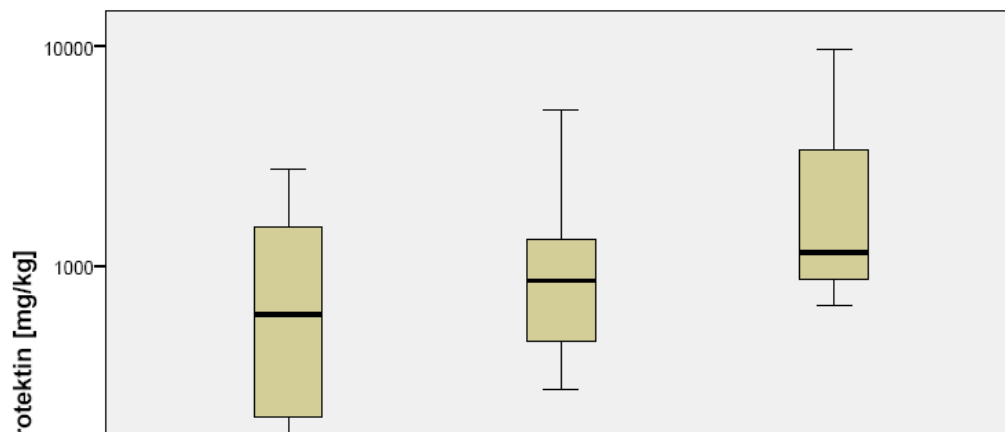
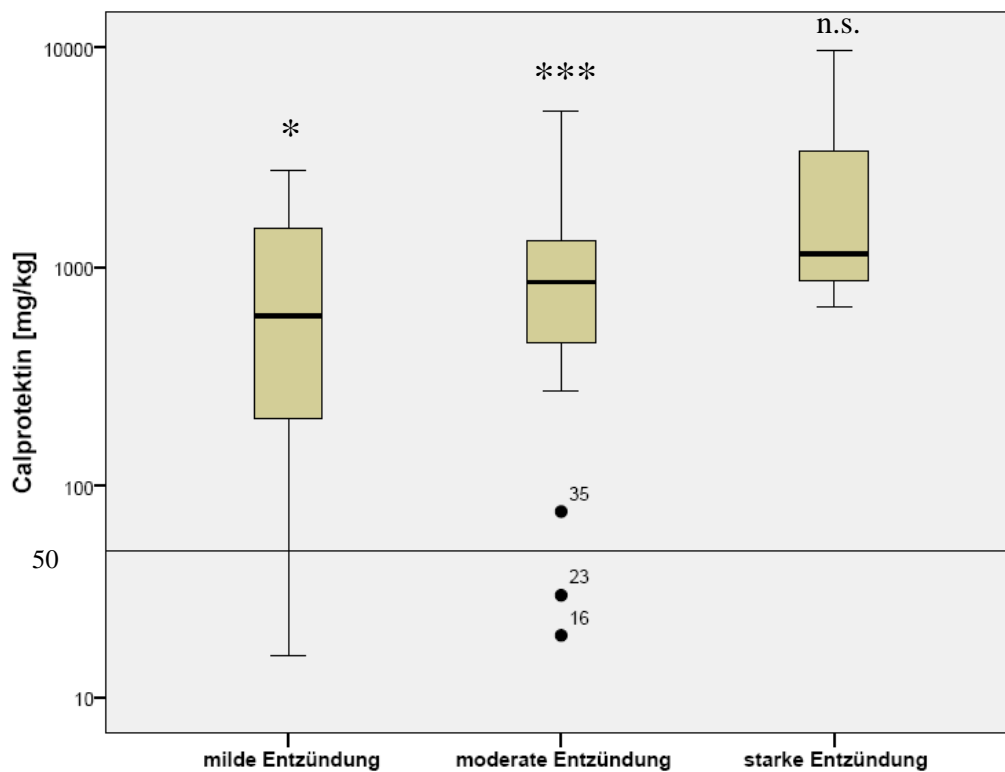
In
Er
zw

amt. Die
Hilfe des
tastisch

untersucht. Da nur ein Patient mit der Diagnose Proktitis in die Studie aufgenommen werden konnte, war eine statistische Auswertung in dieser Untergruppe nicht möglich.

Bei Patienten mit einer Sigmoiditis lag das Calprotektin im Median bei 904 mg/kg und war damit im Vergleich zum angegebenen oberen Normalwert von 50 mg/kg hochsignifikant erhöht. Im Falle einer linkseitigen Kolitis lag das fäkale Calprotektin im Median bei 73 mg/kg, im Mittelwert bei 1733 mg/kg. Diese Erhöhung war statistisch aufgrund einer zu geringen Fallzahl ($n = 3$) nicht signifikant (siehe Abb. 26 auf S. 95).

In der Gruppe der Patienten mit einer Pankolitis lag das fäkale Calprotektin im Median bei 1262 mg/kg und war damit im Vergleich zum oberen Normalwert hochsignifikant erhöht ($p = 0,001$).



In einer weiteren Analyse wurde das fäkale Calprotektin in den Subgruppen mit unterschiedlichen histologischen Entzündungsgraden statistisch untersucht. Die Analyse wurde mit dem zweiseitigen Wilcoxon Rangsummen Test für verbundene Stichproben durchgeführt (Abb. 27 auf S. 96).

In der Gruppe mit milden Entzündungsveränderungen lag das fäkale Calprotektin im Median bei 603,58 mg/kg. Diese Erhöhung war in Bezug auf den oberen Normalwert von 50 mg/kg signifikant ($p = 0,03$). Bei moderater Entzündung lag der Median bei 851 mg/kg und war statistisch hochsignifikant ($p = 0,001$) erhöht. Die Gruppe mit starker Entzündung hatte mit einem Median von 1149,50 ein deutlich erhöhtes Calprotektin. Aufgrund der geringen Fallzahl ($n = 4$) war diese Erhöhung jedoch statistisch nicht signifikant.

Die Werte des fäkalen Calprotektins korrelierten nicht mit den in dieser Studie untersuchten MMPs.

5.3 Ergebnisse der Immunhistochemie

5.3.1 MMP-13

Die Lokalisation von MMP-13 im Darmepithel haben wir mit Hilfe der immunhistochemischen Färbungen untersucht. Dabei wurden die untersuchten MMPs und verschiedene Co-Färbungen in einer Krankprobe und einer patientinternen Referenzprobe farblich dargestellt und auf Unterschiede hin untersucht.

In einer ersten Serie wurde ein Co-Antikörper gegen von Willebrand-Faktor (vWF) aufgetragen. Der von Willebrand Faktor ist vor allem in den Endothelien der Blutgefäße vorhanden. Die Abb. 28 und 29 zeigen die durch Überlagerung der Photos mit Hilfe des Programms Photo-Shop (Version 9.0.2) dargestellte immunhistochemischen Färbungen.

MMP-13 konnte in unseren Färbungen sowohl in der Gesundprobe als auch in der Krankprobe in den Endothelien der Blutgefäße lokalisiert werden. In der Krankprobe zeigte sich eine gesteigerte Angiogenese mit deutlich mehr kleinen Blutgefäßen. Deshalb ist in der immunhistochemischen Darstellung vermehrt MMP-13 zu sehen.

Die immunhistochemische Darstellung bestätigt die Ergebnisse unserer PCR-Analysen, die eine hochsignifikante Erhöhung der Genexpression von MMP-13 in den Krankproben aufweisen.

Die Krankprobe zeigte eine hohe Einwanderung von Leukozyten in die Darmschleimhaut. Eine vermehrte Lokalisation von MMP-13 im Bereich der eingewanderten Lymphozyten war, nach Färbung mit dem Co-Antikörper gegen CD3, nicht zu erkennen. Die besonders hellen Farbsignale im Bereich der Mucosa stellen Ceroidmakrophagen dar. Diese sind neben den Endothelzellen mit dem in ihnen enthaltenen MMP-13 besonders gut in der größten Vergrößerung in Abb. 30 auf S. 101 dargestellt.

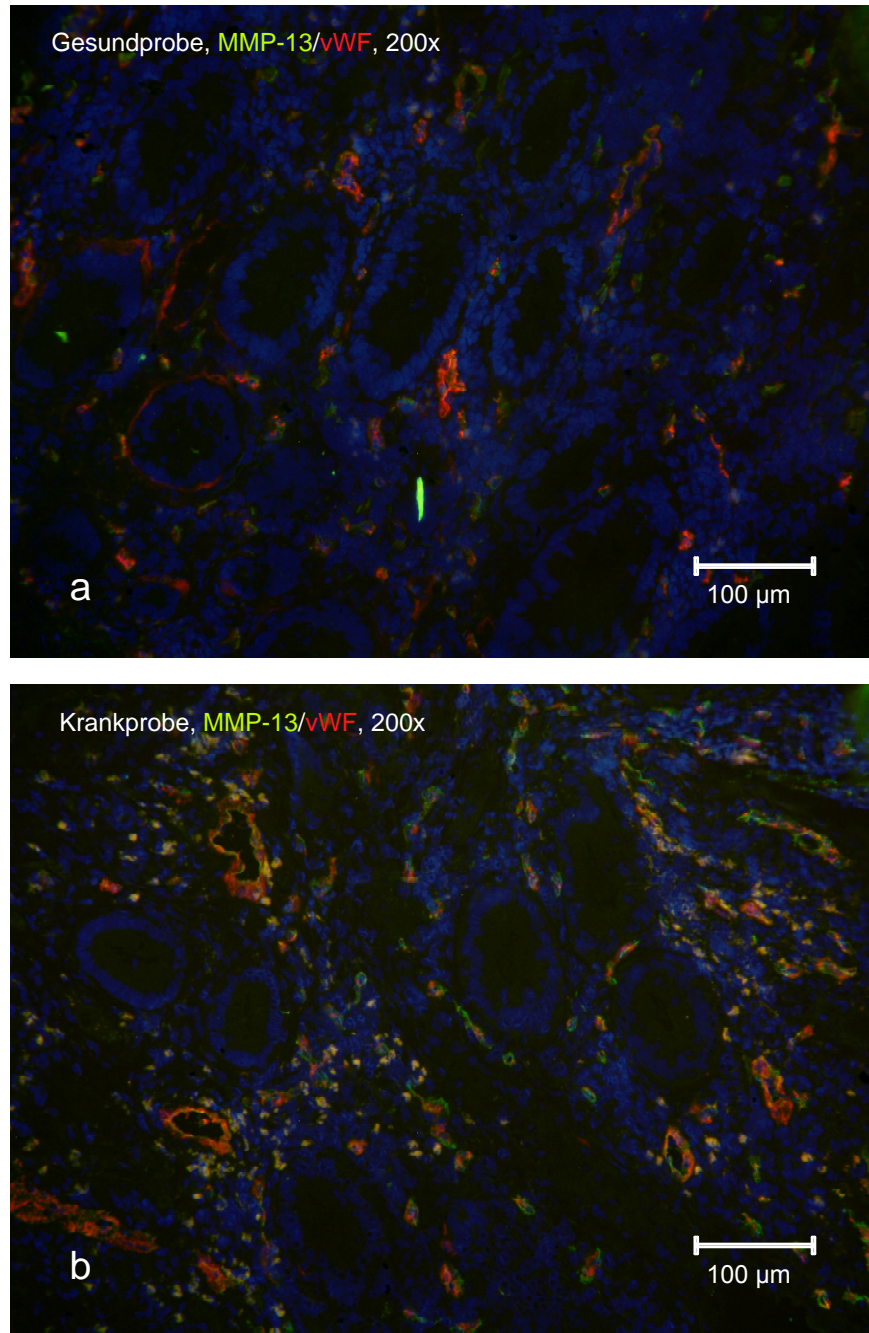


Abbildung 28: Immunhistochemische Darstellung von MMP-13 im Übersichtsbild bei 200-facher Vergrößerung. Co-Färbung von MMP-13 (grün) und von Willebrand-Faktor (rot). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Die weißen Autofluoreszenzen stellen Ceroidmakrophagen dar und sind ein unspezifisches Zeichen für Inflammation. **a** Gesunde Darmschleimhaut, **b** CU mit moderater Entzündungsaktivität.

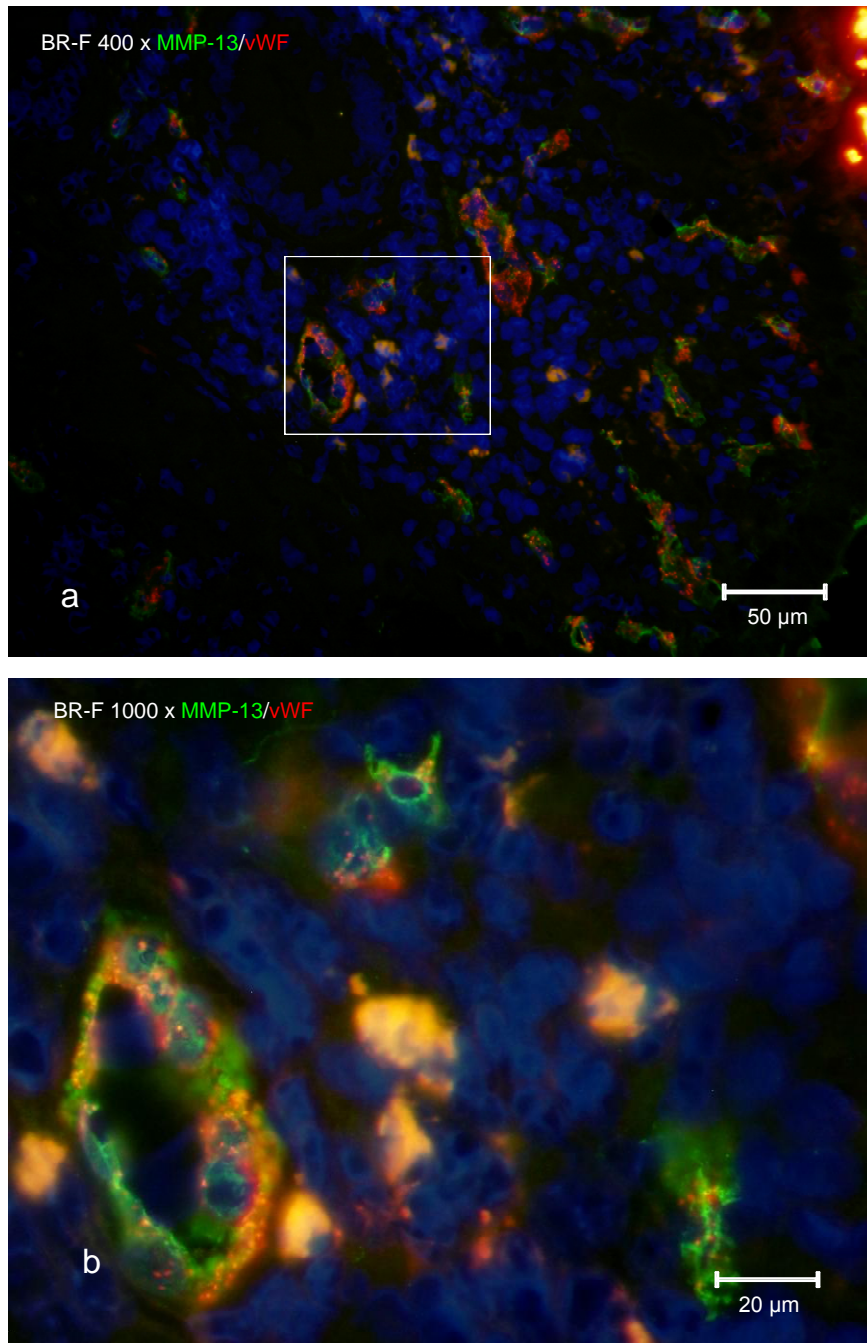


Abbildung 29: Immunhistochemische Darstellung von MMP-13 bei CU mit moderater Entzündungsaktivität. a Co-Färbung von MMP-13 (grün) und von Willebrand Faktor (rot) bei 400-facher Vergrößerung. Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau) **b** Darstellung des in **a** markierten Ausschnittes mit 1000-facher Vergrößerung.

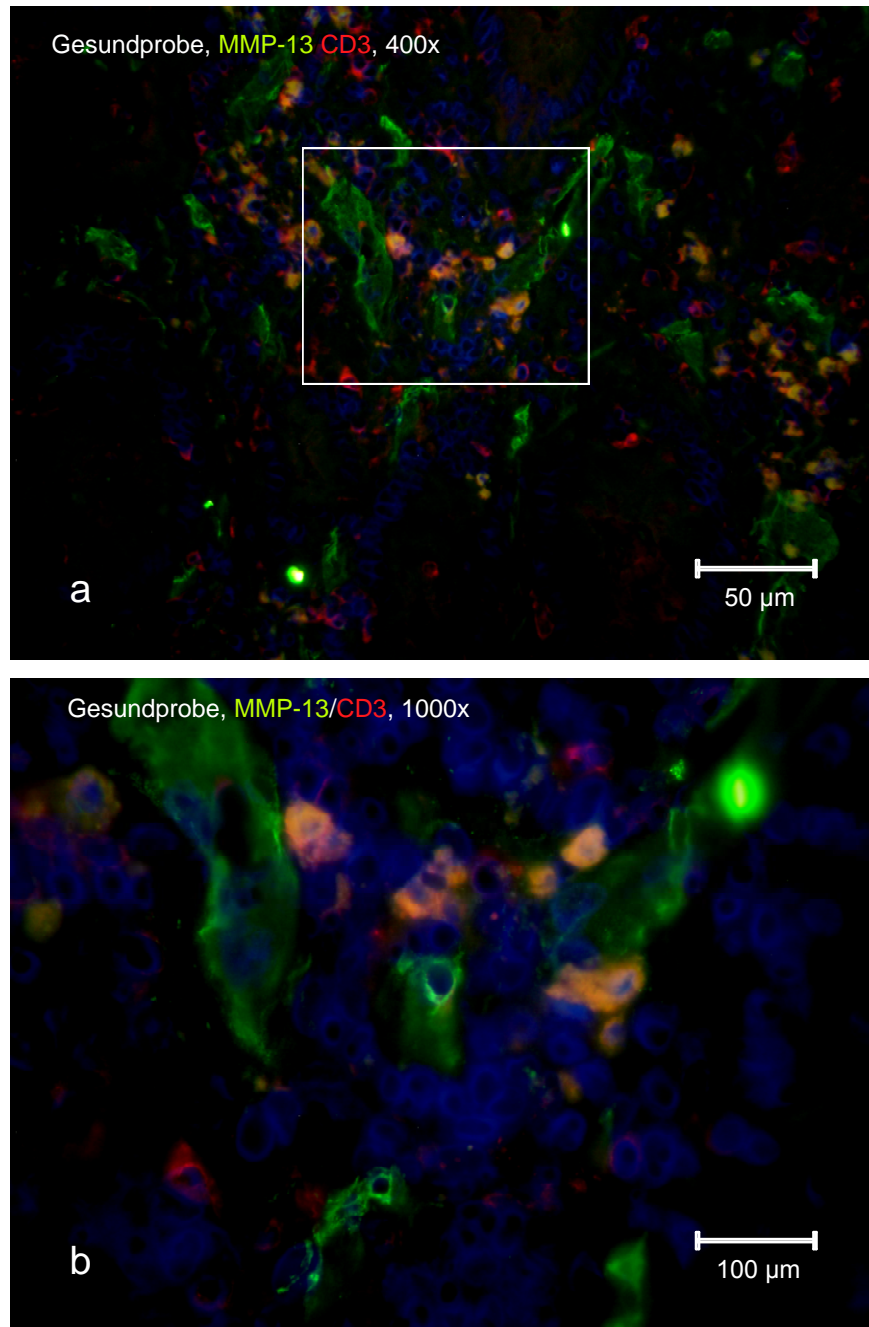


Abbildung 30: Immunhistochemische Co-Färbung von MMP-13 (grün) und CD3 (rot) in einer Gesundprobe. Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). **a** Übersichtsbild in 400-facher Vergrößerung. **b** Der in **a** markierte Ausschnitt in 1000-facher Vergrößerung

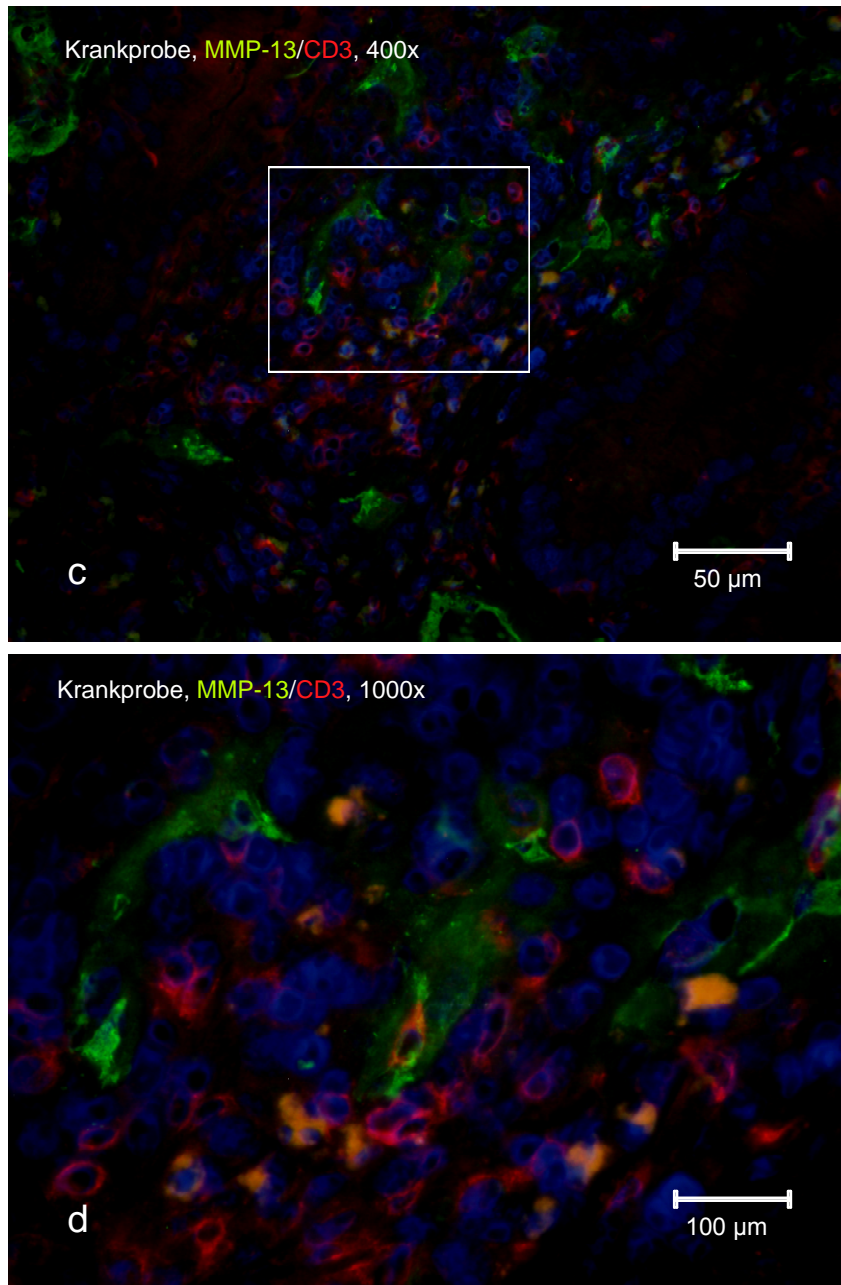


Abbildung 31: Immunhistochemische Co-Färbung von MMP-13 (grün) und CD3 (rot) bei CU mit moderater Entzündungsaktivität. Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). **a** Übersichtsbild in 400-facher Vergrößerung. **b** der in **a** markierte Ausschnitt in 1000-facher Vergrößerung

5.3.2 MMP-28

Bei der Bestimmung der Genexpression von MMP-28 mittels RT-PCR konnten wir zeigen, dass die Expression von MMP-28 bei Vorliegen von Entzündungsveränderungen um ca. die Hälfte im Vergleich zu den Referenzproben reduziert ist. Dieses Ergebnis war hochsignifikant.

Mit Hilfe der Immunhistochemie wollten wir dieses Ergebnis bestätigen und zusätzlich untersuchen, in welchen Zellen MMP-28 im Darmepithel vorhanden ist.

In unseren Färbungen konnten wir MMP-28 den Epithelzellen der Darmmucosa zuordnen. Im Vergleich zur Referenzprobe zeigte die Krankprobe dabei eine deutlich reduzierte Menge an MMP-28. In den Epithelzellen war MMP-28 sowohl in der Krank-, als auch in der Referenzprobe, lumennah am stärksten angereichert.

Die Abb. 32 und 33 ab Seite 104 zeigen die immunhistochemischen Färbungen von MMP-28 in einer Krankprobe und der zugehörigen patientinternen Referenzprobe.

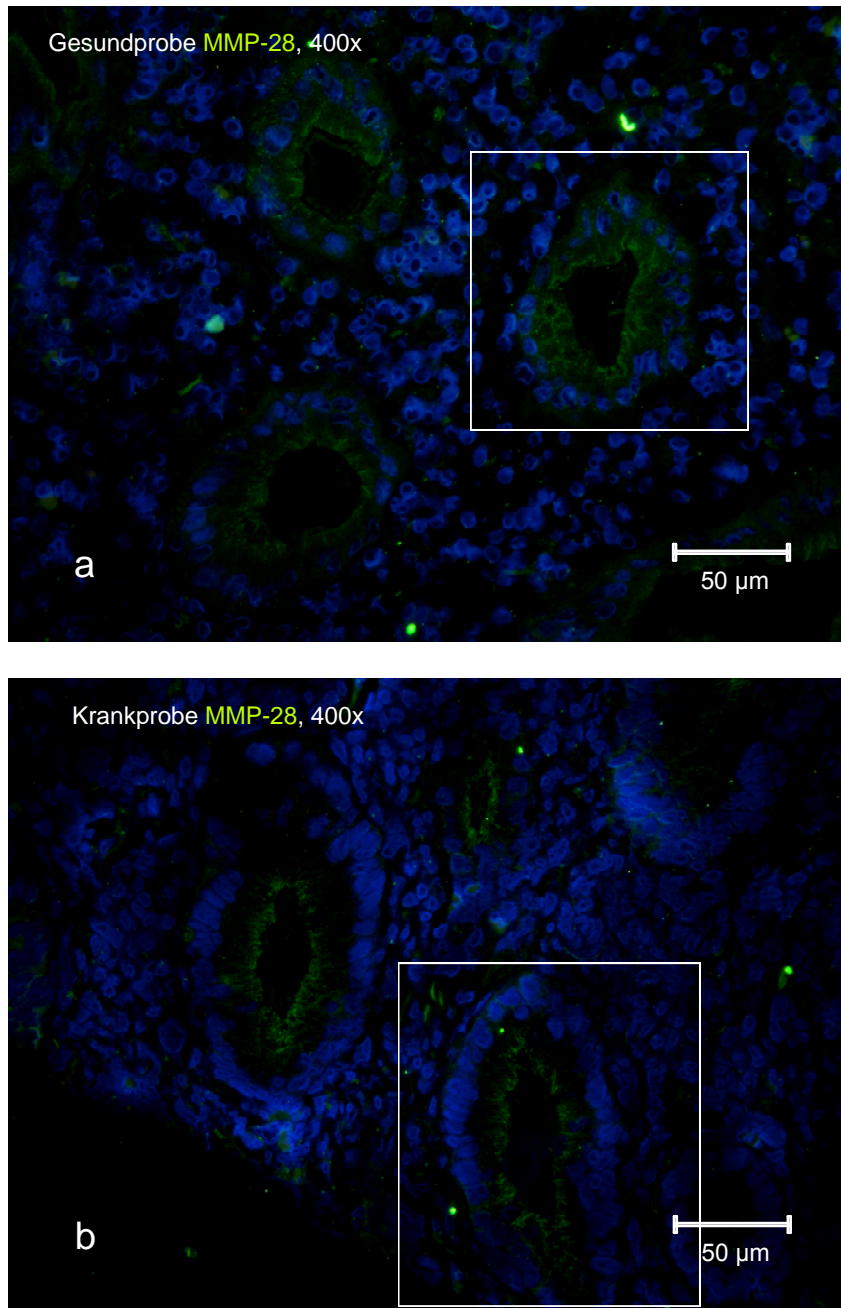


Abbildung 32: Immunhistochemische Darstellung von MMP-28 (grün) bei 400-facher Vergrößerung. Kernfärbung mit DAPI (blau).
a Gesundprobe mit histologisch normaler Darmschleimhaut. **b** Krankprobe bei CU mit moderater Entzündungsaktivität.

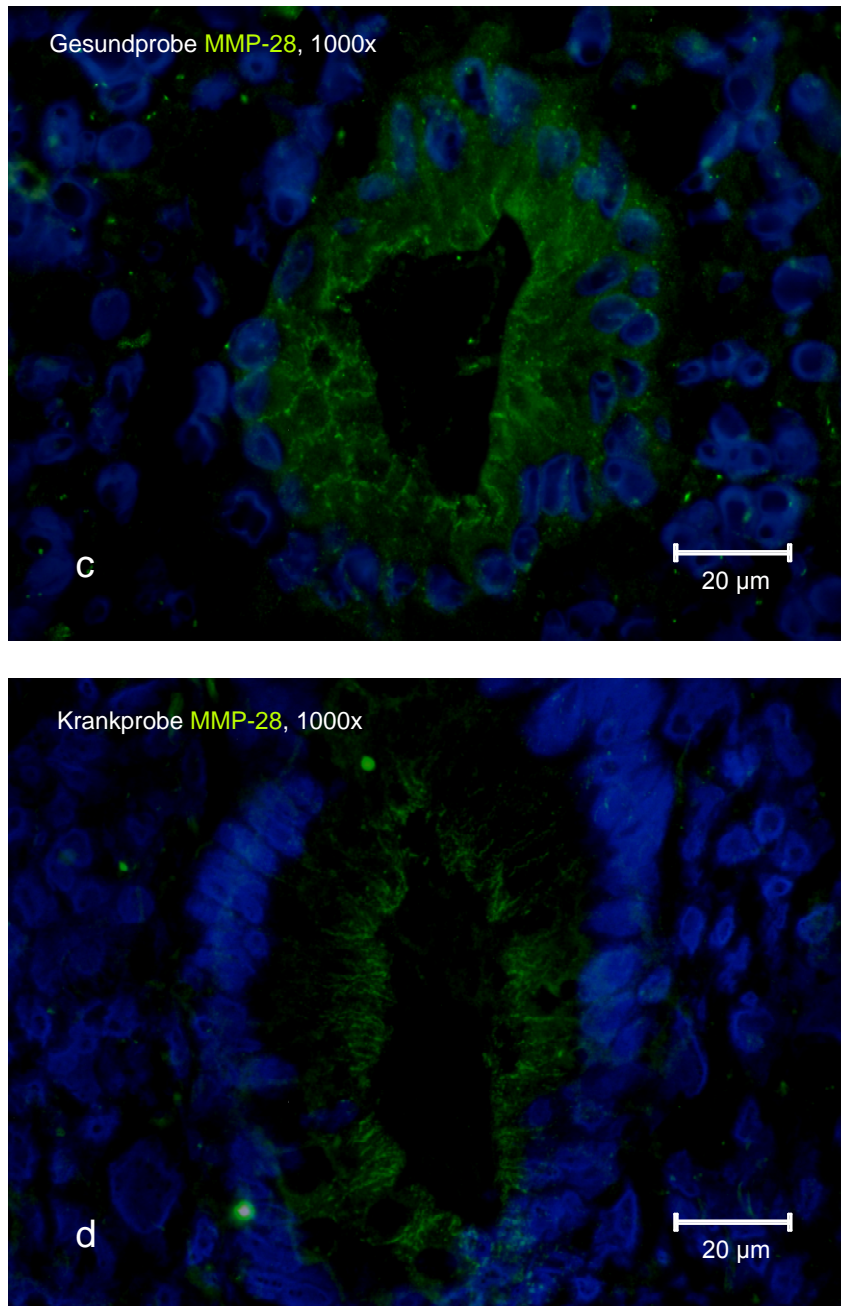


Abbildung 33: Immunhistochemische Darstellung von MMP-28 (grün) bei 1000-facher Vergrößerung der in den in Abb. 32 markierten Ausschnitten. c Gesundprobe mit histologisch normaler Darmschleimhaut. **b** CU mit moderater Entzündungsaktivität.

6 DISKUSSION

Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen haben ein erhöhtes Risiko, an Darmkrebs zu erkranken. Bei Vorliegen einer Pancolitis ulcerosa ist nach 30 Jahren Krankheitsdauer eine Inzidenz von 12-20 % für die Ausbildung eines Kolonkarzinoms beschrieben worden^{1,2,32,33,34}.

Im Gegensatz zum spontanen KRK erfolgt die Karzinogenese nicht über die Adenom-Karzinom-Sequenz. Dysplasieveränderungen und invasive Karzinome können sich direkt in der entzündeten Schleimhaut ohne vorherige Bildung eines Adenoms bilden^{46,53,54}. Die Vorsorge vor malignen Veränderungen bei CED stellt deshalb eine besondere Herausforderung dar. Es gibt bis heute noch keine verlässlichen Marker, die eine maligne Transformation im Rahmen einer CED frühzeitig anzeigen können.

Die Ätiologie und Pathogenese der CU und des MC sind bis heute nicht sicher geklärt. Die Erforschung der Bedeutung der MMPs sowohl für den Entzündungsmechanismus als auch im Rahmen der Karzinogenese kann zur Klärung dieser Fragen beitragen.

MMPs sind zink- oder kalziumabhängige Endopeptidasen, die fast alle Bestandteile der EZM degradieren können. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Invasion, Angiogenese und Metastasierung maligner Tumoren.

Roeb et al. konnte 2001 eine signifikant erhöhte Expression von MMP-2 und MMP-9 beim Kolonkarzinom, im Vergleich zur normalen Darmschleimhaut, nachweisen. Beim Rektumkarzinom war eine gegenüber der normalen Mucosa erhöhte Expression dagegen nicht nachweisbar⁴.

Für die Ausbildung der Entzündung ist die Degradation von Kollagenen und Proteinen in der EZM eine Voraussetzung für die Migration von Leukozyten und Makrophagen. Hier spielen die verschiedenen MMPs, wie auch bei der Angiogenese und der Wundheilung, eine wichtige Rolle. Von Lampe konnte 2000 zeigen, dass die Expression von MMP-1, MMP-2 und MMP-3 gut mit dem histologischen Grad der Entzündung im Darm korreliert¹⁰⁴.

Vor allem die MMPs-1, -2, -3, -7, -8, -9, -12, und -14 sind in früheren Studien im Zusammenhang mit CED beschrieben worden^{103,104,109,146,147}. Über MMP-19 und MMP-28 wurden bis heute erst wenige Studien publiziert.

Rath et al. konnte 2006 eine erhöhte Expression von MMP-2, MMP-7, MMP-9 und MMP-13 bei CU und MC nachweisen. Bei adenomatösen Polypen wurden MMP-7 und MMP-13 ebenfalls erhöht exprimiert⁶. Adenomatöse Polypen stellen ein Vorstadium des KRK dar. Eine erhöhte Expression von MMP-7 und MMP-13 ist bei 90 % der KRK nachweisbar¹²³ und sie scheinen beim Wachstum von frühen Adenomen und deren Transformation in invasive Karzinome eine wichtige Rolle zu spielen.

Über die Bedeutung der MMPs bei der Pathogenese der CED und der Entstehung eines Kolitis-assoziierten KRK ist bis heute erst wenig bekannt. Im Rahmen dieser Studie haben wir die Expression der Kollagenasen MMP-1 und MMP-13, des Matrilysins MMP-7 sowie von MMP-19 und MMP-28 bei Vorliegen einer CU untersucht. Aufgrund fehlender adäquater Antikörper war die geplante Analyse von MMP-8 und MMP-26 nicht möglich.

Bei den übrigen MMPs wurde die Genexpression in den Biopsaten mit Entzündungsveränderungen (Krankproben) mit den jeweiligen patienteninternen Referenzproben verglichen. Durch diese patienteninterne Bestimmung der veränderten Genexpression wurden interindividuelle Expressionsschwankungen der MMPs berücksichtigt und die Ergebnisse vergleichbar gemacht.

Frühere Studien haben gezeigt, dass die Regulation der MMPs hauptsächlich durch Transkription erfolgt. Dabei korreliert die RNA-Expression mit der Proteinexpression^{140, 141}. In dieser Arbeit haben wir deshalb bei allen untersuchten MMPs die RNA-Expression mittels RT-PCR bestimmt. Für MMP-7 wurde zusätzlich die Proteinmenge quantitativ mit ELISA bestimmt.

Von Mai 2007 bis Juli 2008 wurden insgesamt 39 Patienten mit CED in die Studie aufgenommen. Bei 35 Patienten lag eine CU, bei vier Patienten ein MC vor. Aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit MC, war eine statistische Auswertung nicht möglich und es wurde auf eine Analyse der MMPs in dieser Subgruppe verzichtet.

Die Gruppe mit CU setzte sich aus 19 weiblichen und 16 männlichen Patienten, mit einem medianen Alter von 37 Jahren zusammen. Die ideale Konstellation mit Vorliegen einer Proktitis, Proktosigmoiditis oder linksseitigen Kolitis, die eine histologisch normale Referenzprobe ermöglichte, lag bei 21 Patienten vor.

MMP-1

Die relative Genexpression von MMP-1 war in den Krankproben, im Vergleich zu den Referenzproben, im Median um das achtfache erhöht. Bei starker Entzündung war die Expression deutlich um das 97-fache erhöht, was aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit starker Entzündung allerdings nicht signifikant war. Unsere Resultate decken sich mit den Ergebnissen früherer Studien, die ebenfalls eine erhöhte Expression von MMP-1 bei CED beobachtet ^{104, 110, 137}.

Außer bei CED wird MMP-1 auch bei anderen Entzündungsveränderungen im Magen-Darmkanal, wie der Zöliakie und dem Magenulkus, vermehrt exprimiert ^{111, 144}. Dies deutet darauf hin, dass MMP-1 auch im Rahmen von primär gutartigen Entzündungen vermehrt exprimiert wird. Bei Vorliegen einer Zöliakie ist ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entstehung von Adenokarzinomen im Dünndarm beschrieben worden. Diese entstehen typischerweise über die Adenom-Karzinom-Sequenz und nicht, wie bei einer CED, direkt in der flachen Darmmukosa ¹⁴⁸.

Auffallend ist, dass MMP-1 sowohl bei den als präkanzerös angesehenen Entzündungsveränderungen im Rahmen einer CED, als auch beim KRK erhöht exprimiert wird. Im Gegensatz dazu ist die Expression bei gutartigen Adenomen nicht erhöht ¹¹². Sehr hohe Expressionswerte von MMP-1 können damit sowohl mit einer starken Entzündung, als auch mit malignen Prozessen einhergehen.

MMP-7

Die relative Genexpression von MMP-7 war bei CU im Median um das 29-fache im Vergleich zu den Referenzproben erhöht. Bei Vorliegen von starken Entzündungsveränderungen war die Expression im Median um das 120-fache erhöht. Aufgrund der geringen Fallzahl konnten wir allerdings keine signifikante Korrelation zum Grad der Entzündung nachweisen.

In unserer Studie an einer lokal begrenzten norwegischen Kohorte haben keine der histologischen Präparate Anzeichen von Dysplasie oder Malignität gezeigt. In einer älteren Studie von 2001 konnte gezeigt werden, dass die Expression von MMP-7 bei Vorliegen einer HGIN höher ist als bei einer LGIN¹²³.

MMP-7 wird von vielen Tumorzellen vermehrt exprimiert. Eine zentrale Beteiligung von MMP-7 an der kolorektalen und inflammations-assoziierten Karzinogenese scheint wahrscheinlich¹⁴⁵. Die Frage, ob MMP-7 ein Indikator für eine beginnende maligne Transformation sein kann, konnten wir aufgrund fehlender Dysplasieveränderungen im untersuchten Material, noch nicht beantworten.

Für MMP-7 haben wir zusätzlich die Proteinmenge qualitativ bestimmt. Sie lag in den Krankproben im Median bei 0,426 ng/ml je 20 µg Gesamtprotein und war damit um das 10-fache erhöht.

MMP-13

In gesunder Darmschleimhaut wird MMP-13 relativ niedrig exprimiert. Eine erhöhte Expression ist vor allem im Rahmen von verschiedenen malignen Tumorerkrankungen bekannt. Für MMP-13 konnten wir eine im Median um des 5,3-fach erhöhte relative Genexpression in den Krankproben im Vergleich zu den Referenzproben nachweisen. Es ist bekannt, dass MMP-13 außer bei Entzündungsveränderungen auch bei adenomatösen Polypen und Karzinomen erhöht exprimiert^{5,6}.

Die relative Genexpression stieg in unserer Studie bei MMP-13 mit dem Grad der Entzündungsveränderungen an. Der Unterschied zwischen den Subgruppen war jedoch statistisch nicht signifikant. Wir vermuten, dass MMP-13, wie auch MMP-7, eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese im Rahmen der CED zukommt. Bei malignen Tumorzellen ist MMP-13 vor allem im Stroma nachweisbar¹⁴².

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen haben wir die Lokalisation von MMP-13 bei CU untersucht und versucht, ihren zellulären Ursprung aufzuzeigen. Die histologischen Schnitte zeigten bei den Krankproben, im Vergleich zur normalen Kolonschleimhaut, eine deutlich erhöhte Anzahl von kleinen Blutgefäßen. Durch immunhistochemische Co-Färbungen mit vWF konnten wir MMP-13 den Endothelzellen der Blutgefäße zuordnen. Das lässt den Schluss zu, dass MMP-13 bei der Angiogenese im Rahmen der chronischen

Entzündung bei der CU von großer Bedeutung ist. Parallel dazu spielt die Angiogenese beim Tumorwachstum eine wichtige Rolle.

Zusammen mit den anderen in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studien, ergibt sich die Vermutung, dass eine erhöhte Expression von MMP-7 und MMP-13 im Rahmen einer CU mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Dysplasien und Karzinomen assoziiert sein kann.

MMP-19

Über die Bedeutung von MMP-19 und MMP-28 im Zusammenhang mit einer CED ist bis heute erst wenig bekannt. Bister et al. konnte 2004 zeigen, dass MMP-19 in entzündeter Darmschleimhaut in Makrophagen und Fibroblasten vermehrt exprimiert wird. Beim KRK konnte keine Erhöhung der Expression nachgewiesen werden ¹³⁰. Diese Studie untersuchte die MMPs nur mit Hilfe der Immunhistochemie und machte keine Aussagen über die tatsächliche Größe der Genexpression.

Wir konnten mit unserer Studie diese immunhistochemischen Befunde auch auf RNA-Ebene bestätigen. Bei den Krankproben mit CU lag eine im Median um das 2,5-fach erhöhte relative Genexpression vor.

MMP-28

Ein Schwerpunkt dieser Studie lag auf der Untersuchung der erst kürzlich klonierten MMP-28 bei CU. Es gib bis heute erst eine Studie, die einen Zusammenhang von MMP-28 und CED untersucht hat. Mittels immunhistochemischer Analysen konnten Bister et al. 2004 zeigen, dass MMP-28 in entzündeter Darmschleimhaut nicht vermehrt exprimiert wird. In normaler Darmschleimhaut war MMP-28 in den apikalen Villi der Ileumschleimhaut nachweisbar ¹³⁰.

In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass die relative Genexpression von MMP-28 bei CU im Median auf die Hälfte reduziert ist. Interessant ist, dass eine verminderte Expression von MMP-28 auch beim KRK beschrieben worden ist ¹³³.

In einer 2009 veröffentlichten Studie, haben Heiskanen et al. die Lokalisation von MMP-28 in vitro in epithelialen Zellkulturen mit Immunfluoreszenz untersucht. Man lokalisierte MMP-28 auf der basolateralen Seite der Epithelzellen ¹⁴³.

In unserer eigenen immunhistochemischen Untersuchung von MMP-28 konnten wir die verminderte Expression in der Krankprobe auch optisch einzelnen Zellen zuordnen. Wir konnten MMP-28 in den Epithelzellen nachweisen. Im Gegensatz zu Heiskanen et al. war MMP-28 allerdings lumennah lokalisiert.

Fäkales Calprotektin

Bei allen Patienten wurde das fäkale Calprotektin in einer Stuhlprobe bestimmt. Es war bei den Patienten mit CU im Median mit 851 mg/kg deutlich über die Normalgrenze von 50 mg/kg erhöht. In der statistischen Auswertung korrelierte die Höhe des fäkalen Calprotektins mit der Krankheitsausdehnung, nicht aber mit dem Grad der Entzündung. Bei Vorliegen einer Pankolitis lagen die Werte höher als bei Vorliegen einer Sigmoiditis. Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer aktueller Studien. Ho et al. haben 2009 gezeigt, dass das fäkale Calprotektin mit dem Grad der Erkrankung korreliert und ein Prediktor für den Behandlungserfolg sein kann ¹⁴⁹. Canani et al. haben 2008 gezeigt dass das fäkale Calprotektin mit dem histologischen Grad der Entzündung korreliert und auch als Marker einer histologisch und endoskopisch verifizierten Remission dienen kann ¹⁵⁰. In einer früheren Studie haben Isaksen et al. gezeigt, dass Calprotektin MMPs durch die Abspaltung (Sequestration) des Zink-Atoms hemmen können. MMP-3, MMP-8 und MMP-13 konnten schon durch relativ kleine Konzentrationen von Calprotektin gehemmt werden. Bei MMP-2 und MMP-9 waren dazu deutlich höhere Konzentrationen nötig ¹⁵³. Die Analyse erfolgte indirekt über den Nachweis von Abbauprodukten der MMPs. In unserer Studie konnten wir keine Korrelation zwischen dem fäkalen Calprotektin und den untersuchten MMPs nachweisen.

Fazit

In der von uns untersuchten Population von Patienten mit einer CU konnten wir eine hochsignifikante Erhöhung der relativen Genexpression von MMP-1, MMP-7, MMP-13 und MMP-19 nachweisen. Die Genexpression von MMP-28 dagegen war hochsignifikant erniedrigt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Genexpression der untersuchten MMPs mit dem Grad der Entzündung ansteigt. Der Unterschied innerhalb der Subgruppen war statistisch allerdings nicht signifikant. Eine Ursache dafür kann die geringe Fallzahl innerhalb der Gruppe mit starken Entzündungsveränderungen sein.

Die MMPs scheinen eine wichtige Rolle im Krankheitsmechanismus der CED zu spielen. In der Zukunft kann man auf dem Boden dieser Befunde potentielle neue Therapiestrategien entwickeln. In Tiermodellen haben MMP-Inhibitoren eine Verminderung der Entzündungsaktivität gezeigt ^{151, 152}.

Die Bedeutung der MMPs für die Colitis-assoziierte kolorektale Karzinogenese wird zurzeit in unserer Arbeitsgruppe untersucht. Die erhöhte Expression von MMP-1, MMP-2, MMP-13, MMP-7, MMP-9, MMP-12 und MMP-13 beim KRK ist gut dokumentiert. Nachdem Rath et al. 2006 zeigen konnten, dass MMP-7 und MMP-13 sowohl bei adenomatösen Polypen als auch bei CED erhöht exprimiert wird, haben wir in dieser Studie die Genexpression verschiedener MMPs bei Vorliegen einer CED hin untersucht und ihren zellulären Ursprung geklärt. Da wir bei keinem der Patienten Dysplasieveränderungen oder manifeste Malignität nachweisen konnten, konnten wir die Auswirkungen dieser Veränderungen auf die Genexpression der MMPs nicht analysieren. Da die chronischen Darmentzündungen als gastrointestinale Präkanzerosen gelten, vermuten wir bei besonders hohen Werten der Genexpression von MMP-7 und MMP-13 auch ein hohes Risiko für die Entstehung von Dysplasien und invasiven KRK. Dieser Verdacht wird noch dadurch erhärtet, dass wir MMP-13 den Endothelien der kleinen Blutgefäße zuordnen konnten und die Angiogenese bei Tumorerkrankungen eine bekanntermaßen wichtige Rolle spielt.

MMP-28 wurde bis heute nicht mit der Invasion maligner Zellen assoziiert und wurde in gesunder Darmschleimhaut nachgewiesen. Wir konnten jetzt erstmals die relative Genexpression von MMP-28 bei CU mittels RT-PCR darstellen. Es zeigte sich eine erniedrigte Genexpression um die Hälfte im Vergleich zur gesunden Darmschleimhaut. MMP-28 scheint eine wichtige Aufgabe in der normalen Darmphysiologie zu spielen und für die epitheliale Wundheilung von Bedeutung zu sein ¹³³.

In unseren immunhistochemischen Färbungen konnten wir MMP-28 folgerichtig den Darmepithelzellen zuordnen. Die Farbintensität war bei Proben mit Entzündungsveränderungen deutlich reduziert.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Patienten, die an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED) leiden, haben ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Dysplasien und bösartigen Tumoren im Dickdarm. Bei Vorliegen einer Pancolitis ulcerosa wurde ein kumulatives Risiko für die Entstehung von Darmkrebs von bis zu 18 % nach 30 Jahren Krankheitsdauer beschrieben².

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) sind zinkbindende Endopeptidasen die fast alle Komponenten der extrazellulären Matrix abbauen können. Dadurch nehmen sie eine zentrale Rolle bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen ein. Eine erhöhte Expression von MMPs konnte bei vielen bösartigen Tumoren nachgewiesen werden¹⁰⁰.

Beim kolorektalen Karzinom (KRK) konnte in früheren Studien unter anderem eine erhöhte Expression von MMP-1, MMP-2, MMP-7 und MMP-13 nachgewiesen werden^{100,156}. Sowohl bei den CED, als auch bei adenomatösen Polypen wird MMP-7 und MMP-13 vermehrt exprimiert⁶. Unklar blieb, ob die erhöhte Expression im Rahmen der CEDs nur ein Resultat der zuerst benignen Entzündung darstellt, oder bereits ein erstes Anzeichen für eine maligne Transformation darstellt. Dies ist deshalb von großem Interesse, weil die maligne Transformation im Rahmen einer CED direkt in der entzündeten Schleimhaut ohne die Zwischenstufe des Adenoms abläuft¹⁴⁰.

In unserer Kohortenstudie, die mit Patienten des Universitätsklinikums Stavanger, Norwegen, durchgeführt wurde, haben wir die Bedeutung der MMPs bei Vorliegen einer CU näher untersucht.

Im Rahmen einer Koloskopieuntersuchung wurden Gewebeproben von einem Schleimhautabschnitt mit den stärksten Entzündungsveränderungen (Krankproben) und von einem Abschnitt mit normaler oder leicht entzündeter Schleimhaut (Referenzproben) entnommen. Die Expression der untersuchten MMPs wurde auf Genniveau mittels RT-PCR bestimmt und dabei jeweils eine Krankprobe mit einer patientinternen Referenzprobe verglichen.

Wir konnten nachweisen, dass die relative Genexpression von MMP-1, MMP-7, MMP-13 und MMP-19 bei Vorliegen einer CU in den Krankproben, im Vergleich zu den Referenzproben, erhöht ist.

Im Falle von MMP-7 wurde die Expression mittels ELISA auch auf Proteinniveau bestimmt. Wir konnten hier die Ergebnisse der relativen mRNA-Expression bestätigen und fanden eine erhöhte Proteinmenge von MMP-7 in den Krankproben.

Ob besonders hohe Werte der relativen MMP-Genexpression bereits einen Hinweis auf eine beginnende maligne Transformation darstellen, konnte im Rahmen der vorliegenden Studie aufgrund fehlender Gewebeproben mit Dysplasieveränderungen nicht beantwortet werden.

Für MMP-28 fanden wir eine Erniedrigung der relativen Genexpression in den Krankproben. Im Gegensatz zu vielen anderen MMPs wird MMP-28 in gesunder Darmschleimhaut relativ hoch exprimiert. Es scheint bei der epithelialen Wundheilung von Bedeutung zu sein.

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen haben wir den zellulären Ursprung von MMP-13 und MMP-28 ermittelt. MMP-13 konnten wir den Endothelzellen der Blutgefäße in der Darmmucosa zuordnen. In der untersuchten Krankprobe waren deutlich mehr kleine Blutgefäße als in der Referenzprobe und dadurch mehr MMP-13 Signale vorhanden. MMP-28 konnten wir den Epithelzellen der Darmschleimhaut zuordnen. Auffällig war dabei die deutliche Anreicherung von MMP-28 auf der lumennahen Seite der Epithelzellen. Immunhistochemisch war in der Krankprobe deutlich weniger MMP-28, als in der Referenzprobe nachweisbar. Dies bestätigt die Ergebnisse der Bestimmung der relativen Genexpression.

8 SUMMARY

Patients with inflammatory bowel disease (IBD) have an increased risk for dysplasia and colorectal cancer (CRC). In case of pancolitis CRC is thought to occur in 18 % after 30 disease-years².

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc-dependent endopeptidases which are able to catalyze the complete degradation of extra cellular matrix. Therefore MMPs play an important role in many physiological and pathological processes. An increased expression of MMPs has been shown in many malignant tumors¹⁰⁰. Recent studies have shown that the level of MMP-1, MMP-2, MMP-7 and MMP-13 is increased in colorectal cancer^{100,156}.

The expression of MMP-7 and MMP-13 is increased in both, adenomatous polyps and inflammatory bowel disease⁶. Until today it is not clear if the increased expression in IBD is just the result of a benign inflammation, or a first signal of malignant transformation. This is of special interest because the malignant transformation in IBD occurs directly in the mucosa without undergoing a adenoma-stadium¹⁴⁰.

In this cohort-study with patients from the Stavanger University Hospital in Norway, we examined the relevance of MMPs in ulcerative colitis.

During a coloscopy we took biopsy samples from areas that macroscopically showed the highest degree of inflammation and from areas with no or mild inflammation (control-group). The gene expression of the MMPs in these groups were analyzed by RT-PCR.

We demonstrated that the relative gene expression of MMP-1, MMP-7, MMP-13 and MMP-19 in ulcerative colitis was increased in areas of inflammation compared with the control areas.

In the case of MMP-7 we measured the expression on protein-level with ELISA. Here we confirmed our results from the RT-PCR and found an overexpression of MMP-7 in inflamed mucosa.

We showed that the relative gene expression of the examined MMPs depends on the histological grad of inflammation. It remains unclear if a highly increased level of these

MMPs can be associated with the progression to intraepithelial neoplasia. In our study we didn't find dysplasia in the samples of the study population.

For MMP-28 we found a decreased relative gene expression in the inflamed areas. In comparison to most other MMPs, MMP-28 is expressed highly in healthy colon mucosa. It seems to be important for epithelial wound healing.

With immunohistochemical staining we showed the cellular origin of MMP-13 and MMP-28. MMP-13 was localized to endothelial cells of the small blood vessels in the colon mucosa. In the sample with inflammation we saw more blood vessels and therefore more MMP-13 than in healthy samples. MMP-28 was localized in the epithelial cells of the colon mucosa and was most concentrated on the luminal side of the epithelial cells. The sample with inflammation showed less MMP-28 which consists with our results from the measurement of the relative gene expression with RT-PCR.

9 AUSBLICK

Die Ergebnisse unserer Studie zeigten eine deutlich erhöhte Genexpression von MMP-1, MMP-7, MMP-13 und MMP-19 bei Colitis ulcerosa. Aufgrund fehlender Gewebeprobe mit Dysplasieveränderungen konnten wir die Frage, ob eine besonders hohe Genexpression ein Zeichen für eine beginnende intraepitheliale maligne Transformation darstellt, nicht beantworten.

Unsere Arbeitsgruppe plant deshalb die Durchführung weiterer Studien, in der dieser Frage nachgegangen werden soll. Ziel ist die Detektion eines MMP-Markerprofils für die Früherkennung kolorektaler Karzinome bei CU.

10 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 BB Crohn, B Rosenberg.** The sigmoidoscopic picture of chronic ulcerative colitis (nonspecific). *Am J Med Sci* 1925;170:220-227
- 2 JA Eaden, KR Abrams, JF Mayberry.** The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001;48:526-535
- 3 E Roeb, S Matern.** Matrix Metalloproteinases: Promoters of tumor invasion and metastasis – A review with focus on gastrointestinal tumors. *Z Gastroenterol* 2001;39:807-13
- 4 E Roeb, CG Dietrich, R Winograd M. Arndt, S Matern.** Activity and cellular origin of gelatinases in patients with colon and rectal carcinoma: Differential activity of matrix metalloproteinase-9. *Cancer* 2001;92:2680-2691
- 5 E Roeb, M Arndt, B Jansen, V Schumpelik, S Matern.** Simultaneous determination of matrix metalloproteinase (MMP)-7, MMP-1, -3, and -13 gene expression by multiplex PCR in colorectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis* 2004;19:518-24
- 6 T Rath, M Roderfeld, J Graf, S Wagner, AK Vehr, CG Dietrich, A Geier, E Roeb.** Enhanced expression of MMP-7 and MMP-13 in inflammatory bowel disease: a precancerous potential? *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12(11):1025-1035
- 7 E Dirks, S Förster, M Thom, E Quebe-Fehling, H Göbell.** Prospektive Untersuchung von Insidens und Prävalenz der Colitis ulcerosa in einer Großstadtbevölkerung in Deutschland (Westliches Ruhrgebiet). *Z. Gastroenterol* 1994;32:332-337
- 8 W Daiss, M Scheurlen, H Malchow.** Epidemiology of inflammatory bowel disease in the country of Tübingen (West Germany). *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989;170:39-43
- 9 S Shivananda, J Lenard-Jones, R Logan, N Fear, L Carpenter, M van Blankenstein.** Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the collaborative study on inflammatory bowel disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690-697
- 10 EV Loftus Jr.** Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504-1517
- 11 K Haug, E Schrumpf, JF Halvorsen, G Fluge, E Hamre, R Skjøllingsstad.** Epidemiology of Ulcerative Colitis in Western Norway. *Scand J Gastroenterol* 1988; 23:517-522

- 12 B Moum, MH Vatn, A Ekbom, E Aadland, O Fausa, N Stray.** Incidence of Ulcerative Colitis and Indeterminate Colitis in four Counties of Southeastern Norway, 1990-93 A Prospective Population-Based Study. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31:4, 362-366
- 13 S Kildebo, K Nordgaard, Aronsen O, R Breckan, PG Burhol, R Jorde.** The Incidence of Ulcerative Colitis in Northern Norway from 1983 to 1986. *Scand J Gastroenterol* 1990; 25:9, 890-896
- 14 U Monsen, O Brostrom, B Nordenvall, G Hellers.** Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 1987;22:214
- 15 CG Mathew, CM Lewis.** Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. *Hum Mol Genet* 2004; 13 Spec No 1:161-168
- 16 NP Thompson, R Driscoll, RE Pounder, AG Wakefield.** Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 1996; 312:95
- 17 JP Hugot, M Chamaillard, H Zouali, S Lesage, JP Cézard, G Thomas.** Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603
- 18 Y Ogura, N Inohara, A Benito, FF Chen, G Nunez.** Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 2001;276:4812-18
- 19 N Inohara, Y Ogura, FF Chen, A Muto, G Nunez.** Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 2001;276:2551-2554
- 20 DK Bonen, JH Cho.** The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124:521-536
- 21 CM Panwala, JC Jones, JL Viney.** A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol* 1998;161:5733-5744
- 22 M Schwab, E Schaeffler, C Marx, MF Fromm, B Kaskas, M Eichelbaum.** Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003;124:26-33
- 23 JP Hugot, M Chamaillard, H Zouali, S Lesage, G Thomas.** Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603
- 24 J Mudter, MF Neurath.** Mucosal T cells: mediators or guardians of inflammatory bowel disease? *Curr Opin Gastroenterol* 2003;19:343-349

- 25 G Opdenakker, PE van den Steen, B Dubois, I Nelissen, E Van Coillie, J Van Damme.** Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 2001;69:851-859
- 26 A Coste, L Dubuquoy, K Schoonjans.** LRH-1-mediated glucocorticoid synthesis in enterocytes protects against inflammatory bowel disease. *PNAS* 2007;104:13098-13103
- 27 MV Tobin, RF Logan, MJ Langman, RB McConnell, IT Gilmore.** Cigarette smoking and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1987; 93:316
- 28 S Ghosh, A Shand, A Ferguson.** Ulcerative colitis. *Br Med J* 2000; 320: 1119-1123
- 29 RC Ayres, CD Gillen, RS Walmsley, RN Allan.** Progression of ulcerative proctosigmoiditis: incidence and factors influencing progression. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8:555
- 30 SS Rao, CD Holdsworth, NW Read.** Symptoms and Stool patterns in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1988; 338: 616-618
- 31 M Tanaka, RH Ridell, H Saito, Y Soma, H Hidaka, H Kudo.** Morphologic criteria applicable to biopsy specimen for effective distinction of inflammatory bowel disease from other forms of colitis and of Crohn's disease from ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:55-67
- 32 A Ekbom, C Helmik, M Zack, HO Adami.** Ulcerative colitis and colorectal cancer: A population-based study. *N Engl J Med* 1990; 323:1228
- 33 SN Gyde, P Prior, RN Allan, A Stevens, DP Jewell, SC Truelove, R Lofberg, O Brostrom, G Hellers.** Colorectal cancer in ulcerative colitis: A cohort study of primary referrals from three centers. *Gut* 1988; 29:206
- 34 JE Lennard-Jones, DM Melville, BC Morson, JK Ritchie, CB Williams.** Precancer and cancer in extensive ulcerative colitis: Findings among 401 patients over 22 years. *Gut* 1990; 31:800
- 35 B Levin.** Inflammatory bowel disease and colon cancer. *Cancer* 1992; 70:1313
- 36 AJ Greenstein, DB Sacher, H Smith, A Pucillo, AE Papatestas, I Kreel, SA Geller, HD Janowitz, AH Aufses Jr.** Cancer in universal and left-sided ulcerative colitis: Factors determining risk. *Gastroenterology* 1979; 77:290
- 37 U Broome, R Lofberg, B Veress, LS Eriksson.** Primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: evidence for increased neoplastic potential. *Hepatology* 1995;22:1404-1408
- 38 PM Choi, MP Zelig.** Similarity of colorectal cancer in Crohn's disease and ulcerative colitis: Implications for carcinogenesis and prevention. *Gut* 1994; 35:959
- 39 MO Blackstone, RH Riddell, BH Rogers, B Levin.** Dysplasia associated lesion or mass (DALM) detected by colonoscopy in long-standing ulcerative colitis: An indication for colectomy. *Gastroenterology* 1981; 80:366

- 40 K Suzuki, T Muto, M Shinozaki, T Yokoyama, K Matsuda, T Masaki.** Differential diagnosis of dysplasia associated lesions or mass and coincidental adenoma in ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum* 1998; 41:322
- 41 A Ekbom, C Helmick, M Zack, HO Adami.** Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet* 1990;336:357-359
- 42 SN Gyde, P Prior, JC Macartney, H Thompson, JA Waterhouse, RN Allan.** Malignancy in Crohn's disease. *Gut* 1980;21:1099-1103
- 43 P Munkholm, E Langholz, M Davidsen, V Binder.** Intestinal cancer risk and mortality in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1993;105:1716-1723
- 44 CN Bernstein, F Shanahan, WM Weinstein.** Are we telling patients the truth about surveillance colonoscopy in ulcerative colitis? *Lancet* 1994; 343:71-74
- 45 RH Ridell, H Goldman, DF Ransohoff, HD Appelman, CM Fenoglio, RC Haggitt, C Ahren, P Correa, SR Hamilton, BC Morson.** Dysplasia in inflammatory bowel disease: Standardised classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol* 1983; 14:931
- 46 ER Fearon, B Vogelstein.** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-767
- 47 J Groden, A Thliveris, W Samowitz, M Carlson, L Gelbert, H Albertsen, G Joslyn, J Stevens, L Spirio, M Robertson.** Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991;66:589-600
- 48 B Vogelstein, ER Fearon, SR Hamilton, SE Kern, AC Preisinger, M Leppert, Y Nakamura, R White, AM Smits, JL Bos.** Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-532
- 49 AP Feinberg, CW Gehrke, KC Kuo, M Ehrlich.** Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res* 1988;48:1159-1161
- 50 JL Bos, ER Fearon, SR Hamilton, M Verlaan-de Vries, JH van Boom, AJ van der Eb, B Vogelstein.** Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987;327:293-297
- 51 O Delattre, S Olschwang, DJ Law, T Melot, Y Remvikos, RJ Salmon, X Sastre, P Validire, AP Feinberg, G Thomas.** Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer. *Lancet* 1989;2:353-356
- 52 DC Chung, AK Rustgi.** DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology* 1995;109:1685-1699
- 53 SH Itzkowitz.** Molecular biology of dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2006; 35:553-571

- 54 K Schulmann, Y Mori, V Croog, J Yin, A Olaru, A Sterian, F Sato, S Wang, Y Xu, E Deacu, AT Berki, JP Hamilton, T Kan, JM Abraham, W Schmiegell, N Harpaz, SJ Meltzer.** Molecular phenotype of inflammatory bowel disease-associated neoplasms with microsatellite instability. *Gastroenterology* 2005; 129:74-85
- 55 G Baldassarre, MS Nicoloso, M Schiappacassi, E Chimienti, B Belletti.** Linking inflammation to cell cycle progression. *Curr Pharm Des* 2004;10:1653-1666
- 56 M Steinbakk, CF Naess-Andresen, I Dale, P Brandtzaeg, MK Fagerhol, E Lingaas.** Antimicrobial actions of calcium binding leukocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* 1990. 336:763-765
- 57 UL Fagerberg, L Löf, J Lindholm, LO Hansson, Y Finkel.** Fecal calprotectin levels in healthy children studied with an improved assay. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 37:468-472
- 58 AG Roseth, MK Fagerhol, E Aadland, H Schjønby.** Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces: a methodologic study. *Scand J Gastroenterol* 1992. 27:793-798
- 59 J Tibble, K Teahon, B Thjodleifsson, A Roseth, G Sigthorsson, S Bridger, R Foster, R Sherwood, M Fagerhol, I Bjarnason.** A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 2000. 47:506-513
- 60 G Löffler, PE Petrides.** Biochemie und Pathochemie. 7. Auflage 2002
- 61 VM Kahari, U Saarialho-Kere.** Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997;6:199-213
- 62 N Ortega, Z Werb.** New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J Cell Sci* 2002;115:4201-4214
- 63 J Gross, CM Lapiere.** Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc natl Sci USA* 1962;48:1014-1022
- 64 H Nagase, AJ Barrett, JF Woessner.** Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix (Suppl. 1)*: 421-424
- 65 H Nagase, F Woessner Jr.** Matrix Metalloproteinases. *JBC* 1999;31:21491-21494
- 66 W Bode, C Fernandez-Catalan, H Tschesche, F Grams, H Nagase, K Maskos.** Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:639-652
- 67 XS Puente, AM Pendas, E Llano, G Velasco, C López-Otin.** Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:944-949
- 68 BL Vallee, DS Auld.** Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:220-224

- 69 La Liotta, WG Stetler-Stevenson.** Metalloproteinases and Malignant Conversion: Does Correlation Imply Causality? *Journal of the National Cancer Institute* 1989;81 (8): 556-557
- 70 W Bode, P Reinemer, R Huber, T Kleine, S Schnierer, H Tschesche.** The X-ray crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase inhibited by a substrate analogue reveals the essentials for catalysis and specificity. *EMBO J* 1994;13:1263-1269
- 71 T Pourmotabbed.** Relation between substrate specificity and domain structure of 92 kDa type IV collagenase. *Ann NY Acad Sci* 1994;732:372-374
- 72 J Li, P Brick, MC O'Hare, T Skarzynski, LF Lloyd, VA Curry, IM Clark, HF Bigg, BL Hazleman, TE Cawstone.** Structure of full-length porcine synovial collagenase reveals a C-terminal domain containing a calcium-linked, four-bladed beta-propeller. *Structure* 1995;3:541-549
- 73 L Banyai, H Tordai, L Patthy.** Structure and domain-domain interactions of the gelatin binding site of human 72-kilodalton type IV collagenase (gelatinase A, matrix metalloproteinase 2). *J Biol Chem* 1996;271:12003-12008
- 74 R Somerville, S Oblander, S Apte.** Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biology* 2003;4:216
- 75 H Birkedal-Hansen, WG Moore, MK Bodden, LJ Windsor, B Birkedal-Hansen, A DeCarlo, JA Engler.** Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250
- 76 G Monteleone, R Caruso, D Fina, I Peluso, V Gioia, C Stolfi, MC Fantini, F Caprioli, R Tersigni, L Alessandroni, TT MacDonald, F Pallone.** Control of matrix metalloproteinase production in human intestinal fibroblasts by interleukin 21. *Gut* 2006;55:1774-1780
- 77 M Mori, GF Bernard, K Mimori, H Ueo, T Akiyoshi, K Sugimachi.** Overexpression of Matrix Metalloproteinase-7 mRNA in Human Colon Carcinomas. *Cancer* 1995;75:1516-1519
- 78 AY Stronkin, I Collier, G Bannikov, BL Marmer, GA Grant, GI Goldberg.** Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloproteinase. *J Biol Chem* 1995;270:5331-5338
- 79 K Imai, Y Yokohama, I Nakanishi, E Ohuchi, Y Fujii, N Nakai, Y Okoda.** Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *J Biol Chem* 1995;270:6691-6691
- 80 G Murphy, F Willenbrock.** Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Methods Enzymol* 1995;248:496-510

- 81 DE Gomez, DF Alonso, H Yoshiji, UP Thorgeirsson.** Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74:111-122
- 82 L Guedez, L Courtemanch, M Stetler-Stevenson.** Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood* 1998;92:1342-1349
- 83 U Schönbeck, F Mach, PJ Libby.** Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol* 1998, 161:3340-3346
- 84 S Curran, GI Murray.** Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumor invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 2000; 36:1621-1630
- 85 G Murphy, V Knäuper, S Cowell, R Hembry, H Stanton, G Butler, J Freije, AM Pendás, C Lopez-Otín.** Evaluation of some newer matrix metalloproteinases. *Ann NY Acad Sci* 1999;878:25-39
- 86 K Nabeshima, T Inoue, Y Shimao, T Sameshima.** Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int* 2002;52:255-264
- 87 MJ Duffy, PM McGowan, WM Gallagher.** Cancer invasion and metastasis: changing views. *Journal of Pathology* 2008;214:283-293
- 88 S Curran, GI Murray.** Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumor invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 2000; 36:1621-1630
- 89 Y Itoh, H Nagase.** Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays Biochem* 2002; 38:21-36
- 90 AR Nelson, B Fingleton, ML Rothenberg, LM Matrisian.** Matrix metalloproteinases: Biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000;18:1135-1139
- 91 Q Yu, I Stamenkovic.** Cell surface-located matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000;14:163-176
- 92 MW Olson, M Toth, DC Gervasi, Y Sado, Y Ninomiya, R Fridman.** High affinity binding of latent matrix metalloproteinase-9 to the α 2(IV) chain of collagen IV. *J Biol Chem* 1998;273:10672-10681
- 93 OY Barmina, HW Walling, GJ Fiacco, JM Freije, C López-Otín, JJ Jeffrey, CA Patridge.** Collagenase-3 binds to a specific receptor and requires the low density lipoprotein receptor-related protein for internalization. *J Biol Chem* 1999;274:30087-30093

- 94 CL Wilson, KJ Heppner, PA Labosky, BL Hogan, LM Matrisian.** Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Cancer Res* 1997;94:1402-1407
- 95 T Itoh, M Tanioka, H Yoshida, T Yoshioka, H Nishimoto, S Itohara.** Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase-A-deficient mice. *Cancer Res* 1998;58:1048-1051
- 96 E Deryugina, JP Quigley.** Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:9-34
- 97 KJ Heppner, LM Matrisian, RA Jensen, WH Rodgers.** Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol* 1996;149:273-278
- 98 J Westermarck, VM Kähäri.** Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999;13:781-792
- 99 E Roeb, S Matern.** Matrix metalloproteinases and colorectal cancer. *Medizinische Klinik* 2003;98:763-770
- 100 ZS Zeng, Y Huang, AM Cohen, JG Guillem.** Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase-9. *J Clin Oncol* 1996;14:3133-3140
- 101 S Zucker, J Vacirica.** Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metas Rev* 2004;23:101-117
- 102 G Bouma, W Strober.** The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003;3:521-533
- 103 SL Pender, SP Tickle, AJ Docherty, D Howie, NC Wathen, TT MacDonald.** A major role for matrix metalloproteinases in T cell infury in the gut. *J Immunol* 1997;158:1582-1590
- 104 B von Lampe, B Barthel, SE Coupland, EO Riecken, S Rosewicz.** Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000;47:63-73
- 105 T Kirkegaard, A Hansen, E Bruun, J Brynskov.** Expression and localiation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease. *Gut* 2004;53:701-709
- 106 FE Castaneda, B Walida, M Vijay-Kumar, NR Patel, S Roser, VL Kolachala, M Rojas, L Wang, G Oprea, P Garg, AT Gewirtz, J Roman, D Merlin, SV Sitaraman.** Targeted deletion of metalloproteinase 9 attenuates experimental colitis in mice: central role of epithelial-derived MMP. *Gastroenterology* 2005;129:1991-2008

- 107 P Garg, M Rojas, A Ravi, K Bockbrader, S Epstein, M Vijay-Kumar, AT Gewirtz, D Merlin, SV Sitaraman.** Selective ablation of matrix metalloproteinase-2 exacerbates experimental colitis: contrasting role of gelatinases in the pathogenesis of colitis. *J Immunol* 2006;177:4103-4112
- 108 MT Salmela, SL Pender, ML Karjalainen-Lindsberg, P Puolakkainen, TT MacDonald, U Saarialho-Kere.** Collagenase-1 (MMP-1), matrilysin-1 (MMP-7), and stromelysin-2 (MMP-10) are expressed by migrating enterocytes during intestinal wound healing. *Scand J Gastroenterol* 2004;11:1095-1104
- 109 A Stallmach, CC Chan, KW Ecker, G Feifel, H Herbst, D Schuppan, M Zeitz.** Comparable expression of matrix metalloproteinases 1 and 2 in pouchitis and ulcerative colitis. *Gut* 2000;47:415-422
- 110 A Wiercinska-Drapalo, J Jaroszewicz, R Flisiak, D Prokopowicz.** Plasma matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as biomarkers of ulcerative colitis activity. *World J Gastroenterol* 2003;9:2843-2845
- 111 S Daum, U Bauer, HD Foss, D Schuppan, H Stein, EO Riecken, R Ullrich.** Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut* 1999;44:17-25
- 112 J Shiozawa, M Ito, T Nakayama, M Nakashima, S Kohno, I Sekine.** Expression of matrix metalloproteinase-1 in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol* 2000;13:925-929
- 113 R Hanemaaijer, T Sorsa, YT Konttinen, Y Ding, M Sutinen, H Visser, VW van Hinsbergh, T Helaakoski, T Kainulainen, H Rönkä, H Tschesche, T Salo.** Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor-alpha and doxycycline. *J Biol Chem* 1997;272:31504-31505
- 114 E Pirila, NS Ramamurthy, T Sorsa, T Salo, J Hietanen, P Maisi.** Gelatinase A (MMP-2), collagenase-2 (MMP-8) and laminin-5 gamma2-chain expression in murine inflammatory bowel disease (ulcerative colitis). *Dig Dis Sci* 2003;48:93-98
- 115 D Agarwal, S Goodison, B Nicholson, D Tarin, V Urquidi.** Expression of matrix metalloproteinase 8 (MMP-8) and tyrosinase-related protein-1 (TYRP-1) correlates with the absence of metastasis in an isogenetic human breast cancer model. *Differentiation* 2003;71:114-125
- 116 M Balbin, A Fueyo, AM Tester, AM Pendás, AS Pitiot, A Astudillo, CM Overall, SD Shapiro, C Lopez-Otin.** Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat Genet* 2003;35:252-257
- 117 A Ravi, P Garg, S. Sitaraman.** Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease: boon or a bane? *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:97-107

- 118 MF Leeman, JA McKay, GI Murray.** Matrix metalloproteinase 13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:758-762
- 119 B Wielockx, C Libert, C Wilson.** Matrilysin (matrix metalloproteinase-7): a new promising drug target in cancer and inflammation? *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15:111-115
- 120 K Matsuno, Y Adachi, H Yamamoto, A Goto, Y Arimura, T Endo, F Itoh, K Imai.** The expression of matrix metalloproteinase matrilysin indicates the degree of inflammation in ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 2003;38:348-354
- 121 WC Parks.** Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair Regen* 1999;7:423-432
- 122 CL Wilson, AJ Ouellette, DP Satchell, T Ayabe, YS López-Boado, JL Stratman, SJ Hultgren, LM Matrisian, WC Parks.** Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 1999; 286:113-117
- 123 KJ Newell, LM Matrisian, DK Driman.** Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) expression in ulcerative colitis-related tumorigenesis. *Ann Surg* 2001;233:786-792
- 124 EA Baker, FG Bergin, DJ Leaper.** Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br J Surg* 2000; 87(9):1215-1221
- 125 T Masaki, H Matsuoka, M Sugiyama, N Abe, A Goto, A Sakamoto, Y Atomi.** Matrilysin (MMP-7) as a significant determinant of malignant potential of early invasive colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 2001;84:1317-1221
- 126 R Sedlacek, S Mauch, B Kolb, C Schätzlein, H Eibel, HH Peter, J Schmitt, U Krawinkel.** Matrix metalloproteinase MMP-19 (RASI-1) is expressed on the surface of activated peripheral blood mononuclear cells and is detected as an autoantigen in rheumatoid arthritis. *Immunology* 1998;198:137-143
- 127 J Stracke, M Hutton, M Stewart, AM Pendás, B Smith, C López-Otin, G Murphy, V Knäuper.** Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme. *J Biol Chem* 2000;275:14809-14816
- 128 U Impola, M Toriseva, S Suomela, L Jeskanen, N Hieta, T Jahkola, R Grenman, VM Kähäri, U Saarialho-Kere.** MMP-19 is expressed by proliferating epithelium but disappears with neoplastic differentiation. *Int J Cancer* 2003;103:709-716
- 129 V Djonov, K Högger, R Sedlacek, J Laissue, A. Draeger.** MMP-19: cellular localisation of a novel metalloproteinase within normal breast tissue and mammary gland tumours. *J Pathol* 2001;195:147-155

- 130 V Bister, M Salmela, ML Karjalainen-Lindsberg, J Uria, J Lohi, P Puolakkainen, C Lopez-Otin, U Saarialho-Kere.** Differential Expression of Three Matrix Metalloproteinases, MMP-19, MMP-26 and MMP-28, in Normal and Inflamed Intestine and Colon Cancer. *Dig Dis* 2004;49: 653-661
- 131 G Marchenko, BI Ratnikov, DV Rozanov, A Godzik, EI Deryugina, AY Strongin.** Characterization of matrix metalloproteinase-26, a novel metalloproteinase widely expressed in cancer cells of epithelial origin. *Biochem J* 2001;356:705-718
- 132 J Zhang, Y-J Cao, YG Zhao, QX Sang, E-K Duan.** Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitor of metalloproteinase-4 in human normal cytotrophoblast cells and a choriocarcinoma cell line, JEG-3. *Mol Hum Rep* 2002;7:659-666
- 133 U Saarialho-Kere, E Kerkelä, T Jahkola, S Suomela, J Keski-Oja, J Lohi.** Epilysin (MMP-28) expression is associated with cell proliferation during epithelial repair. *J Invest Dermatol* 2002; 119:14-21
- 134 RS Walmsley, RC Ayres, RE Pounder, RN Allan.** A simple clinical colitis activity index. *Gut* 1998;43:29-32
- 135 M Pfaffl.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2001; Vol 29, No. 9 00
- 136 L Mäkitalo, T Sipponen, P Kärkkäinen, KL Kolho, U Saarialho-Kere.** Changes in matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) expression profile in Crohn's disease after immunosuppressive treatment correlate with histological score and calprotectin values. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24:1157-1167
- 137 Ying-De Wang, Jing-Wei Mao.** Expression of matrix metalloproteinase-1 and tumor necrosis factor- α in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13(44):5926-5932
- 138 S Hemmann, J Graf, M Roderfeld, E Roeb.** Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis: a systematic review with special emphasis on antifibrotic strategies. *J Hepatol* 2007; 46:955-975
- 139 JP Lynch, TC Hops.** The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002; 16:775
- 140 MF Graham, A Willey, YN Zhu, DR Yager, HJ Sugerman, RF Diegelmann.** Corticosteroids repress the interleukin 1 beta-induced secretion of collagenase in human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 1997; 113:1924-1929
- 141 EC Kohn, W Jacobs, YS Kim, R Alessandro, WG Stetler-Stevenson, LA Liotta.** Calcium influx modulates expression of matrix metalloproteinase-2 (72-kDa type IV collagenase, gelatinase A). *J Biol Chem* 1994; 269:21505-21511
- 142 V Knauper, C Lopez-Otin, B Smith, G Knight, G Murphy.** Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996; 271:1544-1550

- 143 T Heiskanen, S Illman, J Lohi, J Keski-Oja.** Epilysin (MMP-28) is deposited to the basolateral extracellular matrix of epithelial cells. *Matrix Biology* 2009; 28:74-83
- 144 Y Otani, Y Sakurai, K Kameyama, N Igarashi, T Yokoyama, T Kubota, K Kumai, M Kitajima.** Matrix metalloproteinase gene expression in chronic gastric ulcer: a potential role of eosinophils in perforation. *J Clin Gastroenterol* 1997; 25(Suppl 1):101-104
- 145 T Rath, M Roderfeld, J Graf, E Roeb.** Matrix-Metalloproteinasen bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen – von der Grundlagenforschung zur klinischen Bedeutung. *Z Gastroenterol* 2009; 47:758-769
- 146 S Arihiro, H Ohtani, N Hiwatashi, A Torii, T Sorsa, H Nagura.** Vascular smooth muscle cells and pericytes express MMP-1, MMP-9, TIMP-1 and type I procollagen in inflammatory bowel disease. *Histopathology* 2001; 39:50-51
- 147 MD Baugh, MJ Perry, AP Hollander, DR Davies, SS Cross, AJ Lobo, CJ Taylor, GS Evans.** Matrix metalloproteinases levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1999; 117:814-822.
- 148 P Green, C Cellier.** Celiac Disease. *N Engl J Med* 2007;357:1731-1743
- 149 GT Ho, HM Lee, G Brydon, T Ting, N Hare, H Drummond, AG Shand, DC Bartolo, RG Wilson, MG Dunlop, ID Arnott, J Satsangi.** Fecal calprotectin predicts the clinical course of acute severe ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2009; 104(3):673-678
- 150 RB Canani, G Terrin, L Rapacciuolo, E Miele, MC Siani, C Puzone, L Cosenza, A Staiano, R Troncone.** Faecal calprotectin as reliable non-invasive marker to assess the severity of mucosal inflammation in children with inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 2008; 40(7):547-553
- 151 P Di Sebastiano, FF di Mola, L Artese, C Rossi, G Mascetta, H Pernthaler, P Innocenti.** Beneficial effects of Batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in rat experimental colitis. *Digestion* 2001; 63:234-239
- 152 AP Sykes, R Boghal, C Brampton, C Chander, C Whelan, ME Parsons, J Bird.** The effect of an inhibitor of matrix metalloproteinases on colonic inflammation in a trinitrobenzenesulphonic acid rat model of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13:1535-1542
- 153 B Isaksen, MK Fagerhol.** Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2001; 54:289-292
- 154 ME Himmel, G Hardenberg, CA Piccirillo, TS Steiner, MK Levings.** The role of T-regulatory cells and Toll-like-receptors in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease. *Immunology* 2008; 125(2):145-153. Review
- 155 H Nagase, R Visse, G Murphy.** Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* 2006; 69:562-573

156 N Elander, P Söderkvist, K Fransén. Matrix metalloproteinase (MMP) -1, -2, -3 and -9 promoter polymorphisms in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2006; 26(1B):791-795

157 J Decock, R Paridaens, S Ye. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases in lung, breast and colorectal cancer. *Clin Genet* 2008; 73(3):197-211

158 J Jahnsen, AG Røseth, E Aadland. Måling av Kalprotektin i feces. *Tidsskr Nor Legeforen* 2009; 129:743-745.

159 JH Baron, AM Connell, JE Lennard-Jones. Variation between observers in describing mucosal appearances in proctocolitis. *Br Med J* 1964; 1:89-92

160 K Takeda, I Kinoshida, Y Shimizu, Y Ohba, T Itoh, Y Matsuno, T Shichinohe, H Dosaka-Akita. Clinicopathological significance of expression of p-c-Jun, TCF4 and beta-Catenin in colorectal tumors. *BMC Cancer* 2008; 8: 328

11 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND TERMINI TECHNICI

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
aqua dest	destilliertes Wasser
ALM	Adenoma like lesion or mass
APC	Adenomatosis polyposis coli
AS	Aminosäure
AT	Annealing temperature
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CARD 15	Caspase activation and recruitment domain 15
Kat. Nr.	Katalog Nummer
CCL2	Chemokine ligand 2
CD	Crohn's disease, Morbus Crohn
CD4	Cluster of differentiation 4
cDNA	complementary DNA
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
cm	Zentimeter
C _T -Wert	Threshold-Wert
CU	Colitis ulcerosa
DALM	Dysplasia associated lesion or mass
DCC-Gen	Deleted in colorectal cancer-Gen
dest.	Destilliert

d.h.	das heisst
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	Doppelsträngige DANN
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamineperoxidsulfat
EGF	Epithelial growth factor
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
Fa.	Firma
FasL	Fas Ligand
g	Gramm
h	hour, Stunde
HB	Homogenizing buffer, Homogenisierungspuffer
HRP	Horseradish-Peroxidase, Meerrettich Peroxidase
IBD	Inflammatory bowel disease
IEN	Intraepitheliale Neoplasie
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin like growth factor
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
kDA	Kilodalton
Konz.	Konzentration
KRK	Kolorektales Karzinom
l	Liter
LED	Light emitting diode
LGIN	Low grade intraepithelial neoplasi
mA	Milliampere
max.	maximal
M	Molar

MCP	Methyl-akzeptierendes Chemotaxisprotein
MDR-Gen	Multidrug resistance Gen
mg	milligram
min	Minute
ml	milliliter
mmol	millimol
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
MSB	Microsomal storage buffer
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MT-MMP	Membrane type matrix metalloproteinase
NBD	Nucleotide binding domain
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
No.	Number, Nummer
NOD2	Nucleotide oligodimerisation domain 2
NTC	No template control
P	Signifikanzlevel
PAR1	Protease activated receptor 1
PBS	Phosphat buffered saline, Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGN	Peptidoglykan
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction
S	Standardabweichung
s.	siehe
SDF-1	Stromal cell derived factor-1

sec	Sekunde
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwertes
Tab.	Tabelle
TBS-N	Tris buffered saline nonidet, Tris gepufferte Kochsalzlösung
TGF	Transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF	Tumor necrosis factor
TRIS	Tris(Hydroxy)aminomethan
U	Units
u.	und
u.a.	unter anderem
UC	Ulcerative colitis, Colitis ulcerosa
vWF	von Willebrand Factor
z.B.	zum Beispiel
Zymo	Zymographie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
5-ASA	5-Aminosalicylic Acid

12 ANHANG

Forespørsel om deltakelse i forskningsprosjekt

Du er henvist til en endoskopisk undersøkelse av tykktarmen (coloskopi). I løpet av prosedyren kan det bli nødvendig å ta små vevsprøver, såkalte biopsier, fra tarmslimhinnen for nærmere diagnostikk. Prøvetakingen er ikke smertefull. Den kan føre til lett blødning, som vanligvis er helt uten betydning.

Ved gastroenterologisk seksjon, Stavanger Universitetssjukehus deltar vi i samarbeid med Universitetet i Giessen, Tyskland, i en internasjonal studie til forskning om inflammatorisk tarmsykdom og utvikling av tarmkreft.

Vi ønsker derfor å ta 4-6 små prøver i tillegg til de som er nødvendige for en rutineundersøkelse, samt en blodprøve. Disse prøvene skal brukes til forskning for å finne bedre terapimuligheter og oppfølging ved forskjellige tarmsykdommer. Analysering av prøvene foregår i Tyskland.

Studien er uavhengig av legemiddelindustrien og er ikke kommersiell.

Deltagelsen i studien er frivillig. Det vil ikke få innvirkning på behandlingen hvis du ikke vil delta.

Prøvene blir aidentifisert og vil bli destruert etter studieslutt i 2009. Alle personidentifiserende opplysninger blir da slettet. Analyseresultatene oppbevares anonymisert til 2019.

Videre spørsmål kan du rette til studieansvarlig lege ved Stavanger Universitetssjukehus, Jörg M. Halwe (Tel.: 05151, e-mail: hajm@sus.no).

Prosjektleder i Norge er seksjonsoverlege Svein Størset, med. avdeling Stavanger Universitetssjukehus.

Erklæring:

Jeg har lest og forstått pasientinformasjonen om den nevnte studien. Jeg har i tillegg fått muntlig forklaring om hensikten av studien samt risikoen av undersøkende lege.

Jeg bekrefter herved at jeg vil delta i studien. Jeg er innforstått med at det blir brukt en vevsprøve fra tarmen samt en blodprøve til forskning og at prøvene sendes aidentifisert til Tyskland.

Jeg er klar over at jeg kan trekke meg fra studien frem til anonymisering i 2009 uten å begrunne dette. Prøvene vil da bli destruert og opplysningene slettet. Jeg har fått en kopi av denne erklæringen.

Anhang 1: Aufklärungsbogen

Protokollskjema

MMP-Ekspresjon ved inflammatorisk tarmsykdom

i samarbeid mellom
Stavanger Universitetssykehus, Norway og Universitätsklinik Giessen/Marburg, Germany

Registr. Code: **XX – X.X.**

Nr. på glassene: 1. **XX - X.X. - A**
2. **XX - X.X. - B**
3. **XX - X.X. - C**
4. **XX - X.X. - D**
5. **XX - X.X. - E**
6. **XX - X.X. - F**

Registrerings dato: _____

Inkluderende lege: _____

(A-C minst inflammasjon, D-F mest)

Anamnese:

Alder: _____ Slekt: _____

Symptomer siden: _____ Diagnosetidspunkt: _____

Tilleggsdiagnoser: _____

Familieanamnese: _____

Med. behandling ved prøvetaking: _____

Symptomscore: _____ Røyker: _____

Endoskopisk diagnose: _____ Endoskopi-score: _____

Histologisk diagnose: _____

Laboratorieprøver:

Hb _____ (g/dl) CRP _____ (mg/l) Leuk _____ (.E09/l) TRC _____ (.E09/l) s-jern _____

Ferritin _____ ASAT _____ (u/l) ALAT _____ (u/l) ALP _____ (u/l) GT _____ (u/l)

Bilirubin _____ Alb _____ (g/l) SR _____ (mm/t) Kreatinin _____ INR _____

Frosnet serum Nr: **XX- X.X. – La**

Calcprotektin: _____

Dyrkning tarpatogene: _____ Clostridium difficile: _____

Kommentar:

Box:

Prosjektleder Norge: Ass. lege Jörg M. Halwe, Med. avd., Stavanger Universitetssykehus

Anhang 2: Protokollschema der Aufnahmeuntersuchung

Nr-X.X.

Endoskopi-Score

MMP-Ekspresjon ved inflammatorisk tarmsykdom

Grad 0 (ingen betennelse)	Normal mucosa
Grad 1 (mild betennelse)	Ødem og redusert karmønster
Grad 2 (moderat betennelse)	Ødem, manglende karmønster og erosjoner
Grad 3 (alvorlig betennelse)	Spontane blødninger og ulcerasjoner

Lokaliasjon:

1. Bare rektum
2. Rektum og sigmoideum
3. Totalcolitt
4. Colon og terminale ileum
5. Bare terminale ileum

Anhang 3: In der Studie benutzter Endoskopiescore.

13 DANKSAGUNG

Ich Danke Frau Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb für die Möglichkeit, dass ich diese Studie in Ihrer Arbeitsgruppe habe durchführen können. Sie hat den Anstoß für diese international aufgebaute Studie gegeben.

Mein besonderer Dank gilt den Kollegen in der Arbeitsgruppe Roeb, insbesondere Dr. med. Timo Rath und Dr. rer. nat. Martin Roderfeld. Ihre Fachkenntnis und Hilfestellung ist mir eine große Hilfe gewesen. Ohne ihre Unterstützung wäre die Studie so nicht durchführbar gewesen. Danke, für die geduldige Einarbeitung in die verschiedensten Labormethoden und Analysemethoden. Dabei habe ich besonders von Dr. Roderfelds exzellenten Kenntnissen in der Immunhistochemie profitiert.

Annette Tschuschner hat mir bei der täglichen Laborarbeit wichtige Hilfestellung gegeben und viele wichtige Vorarbeiten durchgeführt.

Den Kollegen in der gastroenterologischen Abteilung der Universitätsklinik Stavanger danke ich für die gute Zusammenarbeit. Dabei möchte ich besonders die Geduld der Schwestern im Rahmen der Untersuchungen hervorheben. Der flüssige Stickstoff war leider nicht immer da, wo er sein sollte.

Ich danke Sabine Wildhagen von der pathologischen Abteilung und Osmund Nygård vom Krebsforschungsinstitut in Stavanger für die gute Zusammenarbeit.

Meinen Eltern möchte ich herzlich für die tolle Unterstützung in meiner Schul- und Studienzeit danken. Sie haben den Grundstein für alles gelegt.

Ich Danke meiner Frau Line für ihre fast unendliche Geduld während der Durchführung dieser Arbeit.

14 ERKLÄRUNG

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie in der „Satzung der Justus-Liebig Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen, im Februar 2010

Jörg Michael Halwe